

Зазулина Яна Александровна

**ВЫЯВЛЕНИЕ И КОРРЕКЦИЯ УПРАВЛЯЕМЫХ КЛИНИЧЕСКИХ
ПРЕДИКТОРОВ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ МЕТОДА ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Мельников Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Серебренникова Клара Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра семейной медицины, профессор кафедры.

Давидян Лиана Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, кафедра последипломного образования и семейной медицины, профессор кафедры.

Ведущая организация: Казанская государственная медицинская академия – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань.

Защита диссертации состоится «__» _____ 201_ г. в 1_.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.04 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171; <http://www.samsmu.ru/files/referats/>).

Автореферат разослан «__» _____ 201_ г.

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

Жирнов Виталий Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Отсутствие тенденции к снижению частоты бесплодных браков является актуальным вопросом современного здравоохранения. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, распространенность бесплодия в мире составляет 10–15% [Mascarenhas M.N. et al., 2012]. В условиях невысокой эффективности методов восстановления естественной фертильности внедрение методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в частности экстракорпорального оплодотворения преовуляторных ооцитов и переноса дробящихся эмбрионов в полость матки пациентки (метод ЭКО и ПЭ), расширило возможности преодоления проблемы бесплодного брака. Методы ВРТ являются областью максимальной реализации физических и финансовых ресурсов как отдельной семьи, так и системы здравоохранения, однако также демонстрируют недостаточно высокую эффективность. Согласно отчету Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ) за 2013 год, клиническая беременность регистрируется лишь в 38,5% случаев реализованных переносов эмбрионов в полость матки, тогда как частота завершения индуцированной беременности родами составляет 28,0% [Российская ассоциация репродукции человека. XXXV Юбилейная международная конференция РАРЧ. Регистр ВРТ. Отчет за 2013 год, 2015]. Данное обстоятельство объясняет необходимость поиска модифицируемых факторов, влияющих на результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на достаточное количество соответствующих исследований, в научном сообществе отсутствует единая точка зрения относительно значимости влияния тех или иных факторов на результативность программы ЭКО и ПЭ, а также возможности прогнозирования исхода лечения на этапе прегравидарной подготовки супругов [Амирова А.А., 2011; Краснопольская К.В., Назаренко Т.А., 2013; Bhattacharia S., Maheshwari A., Mollison J., 2013; Владимирова И.В., Калинина Е.А., Донников А.Е., 2014; Maxwell S.M. et al., 2015]. Наименее изученным и наиболее экономически доступным аспектом реализации программ ЭКО и ПЭ является возможность значимого повышения эффективности лечения бесплодия в результате коррекции латентного дефицита железа (ЛДЖ) в ходе прегравидарной подготовки супружеской пары, а также коррекции состояния микроценоза и колонизационной резистентности половых путей на этапе стимуляции суперовуляции [Pelzer E.S., Allan J.A., 2012, Самыкина О.В., 2014]. В условиях значительной гетерогенности основных клинических характеристик супругов, состоящих в бесплодном браке, приоритетным является использование многофакторного анализа предикторов результативности ЭКО и ПЭ, что и обусловило актуальность методологии настоящего исследования.

Цель исследования: повышение эффективности лечения супружеского бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения путем оптимизации тактики раннего выявления и коррекции управляемых факторов риска неблагоприятного исхода программы.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи:**

1. Определить предикторы результативности метода ЭКО и ПЭ, выявляемые на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары.

2. Выявить распространенность ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки у пациенток, состоящих в бесплодном браке, и определить прогностическую значимость ЛДЖ при определении вероятности неблагоприятного исхода программы ЭКО и ПЭ.
3. Выявить предикторы результативности метода ЭКО и ПЭ, регистрируемые в ходе реализации стандартных протоколов стимуляции суперовуляции, пункции фолликулов, оплодотворения ооцитов, культивирования и переноса эмбрионов в полость матки.
4. Провести мониторинг состояния микроценоза и колонизационной резистентности влагалища у пациенток в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ и определить прогностическую значимость полученных результатов.
5. Оценить возможности прогнозирования результативности метода ЭКО и ПЭ на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары и на различных этапах реализации программы с помощью математического моделирования.
6. Разработать алгоритм повышения результативности метода ЭКО и ПЭ, основанный на выявлении и коррекции управляемых факторов риска неблагоприятного исхода программы.

Научная новизна исследования. С помощью метода бинарной логистической регрессии разработана система этапного прогнозирования результативности метода ЭКО и ПЭ, позволяющая осуществлять персонифицированное сопровождение пациентов групп высокого риска неудачного исхода программы. Разработан способ определения амилотической активности отделяемого влагалища, позволяющий исследовать потенциал колонизационной резистентности репродуктивного тракта женщины. Впервые произведено патогенетическое обоснование эффективности применения пребиотика из растительных моносахаридов с целью профилактики дисбиоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ. На основании собственных результатов впервые разработан алгоритм повышения результативности ЭКО и ПЭ, включающий персонифицированную диагностику и коррекцию ЛДЖ у пациентки на этапе прегравидарной подготовки, а также мониторинг и коррекцию состояния микроценоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Практическое значение результатов исследования заключается в повышении результативности лечения бесплодия с помощью ЭКО и ПЭ путем оптимизации тактики реализации программы согласно предложенному алгоритму. Разработанные прогностические модели могут использоваться для стратификации риска неблагоприятного исхода программы ЭКО и ПЭ. Разработанный способ диагностики амилотической активности отделяемого влагалища может быть использован для персонификации противорецидивной терапии дисбиоза влагалища. Полученные результаты и практические рекомендации могут быть включены в процесс обучения студентов медицинских ВУЗов и программы последипломного обучения врачей акушеров-гинекологов и репродуктологов. Результаты исследования могут применяться для оптимизации тактики прегравидарной подготовки пациенток и реализации программы ЭКО и ПЭ в центрах вспомогательных репродуктивных технологий.

Методология и методы диссертационного исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по проблеме идентификации и модификации управляемых клинических предикторов результативности лечения бесплодия методом ЭКО и ПЭ, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами

был разработан план выполнения этапов диссертационного исследования, выбраны объекты исследования, подобран комплекс современных методов исследования. Объектами исследования стали супружеские пары с верифицированным бесплодием и наличием показаний для лечения методом ЭКО и ПЭ. В процессе исследования для выявления значимых предикторов результативности метода ЭКО и ПЭ были использованы методы дескриптивной статистики, а также методы множественной и бинарной логистической регрессии. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При определении индивидуальной вероятности успешного исхода программы ЭКО и ПЭ на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары в качестве значимых прогностических факторов следует рассматривать возраст пациентки, наличие в анамнезе пациентки самопроизвольной беременности и родов живым плодом, передне-задний размер матки, наличие седловидной матки, уровень антимюллера гормона, наличие бесплодия, ассоциированного с эндометриозом, наличие тромбофилии у пациентки, наличие ЛДЖ у пациентки, совпадение более двух локусов системы HLA в супружеской паре.
2. Основными прогностически значимыми факторами, определяемыми в ходе реализации стандартных протоколов ЭКО и ПЭ, являются общее число ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции фолликулов, число полученных эмбрионов хорошего качества и момент переноса эмбрионов в полость матки.
3. Нарушение состояния микроценоза влагалища в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ имеет значительную распространенность и является предиктором отсутствия клинической беременности.
4. Возможности математического моделирования вероятности неблагоприятного исхода программы ЭКО и ПЭ на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары ограничены; наибольшую прогностическую точность имеют математические алгоритмы, использующие данные эмбриологического этапа программы ЭКО и ПЭ.
5. Персонализированная диагностика и коррекция ЛДЖ у пациентки на этапе прегравидарной подготовки, а также профилактика дисбиоза влагалища путем назначения на этапе стимуляции суперовуляции пребиотика из моносахаридов является патогенетически обоснованной и сопровождается значимым снижением риска неблагоприятного исхода программы ЭКО и ПЭ.

Степень достоверности полученных результатов. Степень достоверности полученных в настоящем диссертационном исследовании выводов и положений основана на достаточном по количеству клиническом материале, современных методах исследования, адекватной статистической обработке данных. Результаты исследования проанализированы согласно принципам доказательной медицины с помощью традиционных методов дескриптивной статистики, а также методов мультиномиальной и бинарной логистической регрессии.

Апробация результатов диссертации. Основные положения работы были представлены на VIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2014), Юбилейном Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь – в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2014),

Всероссийской научно-практической конференции «Теоретические и прикладные исследования в области естественных и гуманитарных наук» (Прокопьевск, 2014), Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2014), II межрегиональной конференции молодых учёных и специалистов «Медицинская наука: взгляд в будущее» (Ставрополь, 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые 21 века – от современных технологий к инновациям» (Самара, 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Инновационные технологии в современной медицине» (Самара, 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые 21 века – от идеи к практике» (Самара, 2015). Аprobация диссертации проведена на межкафедральном заседании коллективов кафедр акушерства и гинекологии №1, акушерства и гинекологии №2, акушерства и гинекологии ИПО СамГМУ от 29.06.2016 (протокол №15).

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования включены в программу практических занятий и лекционный курс кафедры акушерства и гинекологии №1 ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, используются в лечебной работе ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия» и ГБУЗ СО «Самарская городская поликлиника №1».

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в выборе темы диссертационной работы, самостоятельном отборе участников исследования, активном участии в обследовании и лечении пациентов на этапах подготовки и реализации программы ЭКО и ПЭ, осуществлении динамического наблюдения пациенток в I триместре индуцированной беременности, мониторинге исходов достигнутых беременностей, формировании массива анализируемых данных путем выкопировки из медицинской документации, участии в проведении статистического анализа и графической обработки полученных данных, внедрении результатов диссертационного исследования в процесс обучения студентов на кафедре акушерства и гинекологии №1 ФГБОУ ВО СамГМУ, а также в лечебную работу ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия» и ГБУЗ СО «Самарская городская поликлиника №1».

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ университета. Диссертационная работа выполнена согласно плану открытых НИОКР в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России в рамках научной темы «Клинические аспекты и медико-организационные технологии сохранения репродуктивного здоровья семьи» (номер государственной регистрации: 01201053583).

Соответствие паспорту специальности. Настоящая диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.01.01 – Акушерство и гинекология, а именно следующим областям исследований:

1. Исследование эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний.
2. Разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний. Оптимизация диспансеризации беременных и гинекологических больных.

3. Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей – в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2014614686. Получено удостоверение на рационализаторское предложение № 374.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, а также выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Библиографический указатель включает 225 источников, из них 86 отечественных и 139 зарубежных. Работа содержит 50 таблиц, 14 рисунков, 1 схему.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Настоящее исследование проводилось на базе ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия» (директор – к.м.н., О.В. Тюмина) в период с сентября 2013 года по май 2016 года. *Первый этап исследования* был посвящен поиску клинических предикторов результативности ЭКО и ПЭ, а также оценке возможностей прогнозирования результативности ЭКО и ПЭ с помощью математического моделирования. *Критериями включения* пациентов в исследование считались: наличие показаний для проведения программы ЭКО и ПЭ согласно Приказу Минздрава России от 30.08.2012 №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», добровольное информированное согласие пациентов на участие в исследовании. В качестве *критериев исключения* рассматривались: наличие у супругов противопоказаний к проведению базовой программы ЭКО, использование в программе половых клеток и эмбрионов донора, суррогатное материнство, наличие в супружеской паре наследственных заболеваний согласно заключению генетика, несостоявшийся ПЭ, отсутствие данных об исходе программы. На момент начала наблюдения в исследование были включены 350 супружеских пар, 2 супружеские пары далее выбыли ввиду несостоявшегося ПЭ. Для первичного анализа значимых закономерностей пациенты были распределены на группы сравнения (ГС). В I ГС были включены 195 супружеских пар (отсутствие беременности на 21 день после ПЭ подтверждено при ультразвуковом исследовании), II ГС составили 153 супружеских пары с верифицированной клинической беременностью независимо от исхода гестации (индуцированная беременность завершилась родами живым плодом в 122 наблюдениях, потеря беременности после 12 недель гестации регистрировалась в 5 наблюдениях, потеря беременности до 12 недель – в 26 наблюдениях II ГС). На *втором этапе исследования* была проведена апробация алгоритма повышения результативности метода ЭКО и ПЭ, основанного на выявлении и коррекции идентифицированных в рамках первого этапа работы управляемых клинических предикторов неблагоприятного исхода программы. На данном этапе в исследование были включены 239 супружеских пар. *Дополнительными критериями включения* на данном этапе являлись: предстоящая первая попытка ЭКО, наличие трубно-перитонеального фактора бесплодия. *Дополнительными критериями исключения* считались: наличие других факторов бесплодия помимо трубно-

перитонеального, возраст пациентки старше 35 лет. Участники второго этапа были распределены на следующие ГС: I_{II} ГС (82 участника, реализация базовой программы ЭКО и ПЭ согласно действующим стандартам); II_{II} ГС (80 участников, реализация программы с выявлением и коррекцией ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки, а также мониторингом микроценоза влагалища на этапе стимуляции суперовуляции); III_{II} ГС (77 участников, реализация программы согласно протоколу II_{II} ГС с профилактикой дисбиоза влагалища с помощью назначения пребиотика из растительных моносахаридов на этапе стимуляции суперовуляции). План реализации программы ЭКО и ПЭ на первом этапе исследования соответствовал требованиям Приказа Минздрава России от 30.08.2012 №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», а также включал следующие специальные методы исследования:

- Диагностику ЛДЖ у пациентки на основании данных определения сывороточного железа (СЖ), трансферрина (ТФ) с подсчетом коэффициента насыщения трансферрина железом (КНТ), сывороточного ферритина (СФ) на биохимическом анализаторе Kone Ultra (Финляндия). Верификация ЛДЖ проводилась согласно следующим критериям: Hb – 115-125 г/л, RBC – $3,75-3,9 \times 10^{12}/л$, Ht – 35,5-37%, СФ – 16-30 нг/мл, КНТ $\geq 20\%$, СЖ $\geq 12,5$ мкмоль/л;

- Определение аллельных вариантов гена ингибитора активатора плазминогена первого типа, гена рецептора тромбоцитарного гликопротеина, гена фактора свертывания V, гена протромбина, гена β -цепи фибриногена, гена метилентетрагидрофолатредуктазы у пациентки на этапе прегравидарной подготовки методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом гидрогелевом микрочипе с использованием набора реагентов «ПФ – Биочип (Фибр)» (Рег. Уд. № ФС 01262006/5317–06) и универсального аппаратно-программного комплекса для анализа биочипов УАПК (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФС 022a2006/3777-06) с программным обеспечением «Imageware»® (ООО «БИОЧИП–ИМБ», РФ).

- Микроскопическое исследование отделяемого влагалища на момент ПЭ, а также через 21 день после ПЭ с интерпретацией результата согласно шкале Ньюджента и классификации Е.Ф. Кира, верификацию дисбиоза влагалища методом ПЦР в реальном времени с количественной оценкой результата (набор реагентов «Фемофлор», ООО «НПО ДНК-Технология», РФ).

- Определение амилалитической активности отделяемого влагалища на момент ПЭ. **Способ определения амилалитической активности отделяемого влагалища** разработан и использован в настоящем исследовании под руководством доцента кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», к.х.н. И.Л. Глазко (**удостоверение на рационализаторское предложение № 374**). Принцип метода основан на колориметрическом определении изменения оптической плотности раствора крахмала вследствие ферментативного гидролиза, обусловленного активностью амилалитических ферментов отделяемого влагалища. Забор нативного материала проводился ложкой Фолькмана из заднего свода влагалища, полученный материал отбирался с рабочей поверхности ложки Фолькмана автоматической одноканальной пипеткой с одноразовым

наконечником емкостью 200 мкл. Отобранную пробу переносили в пробирку для центрифугирования Eppendorf емкостью 5 мл с 2 мл стерильного физиологического раствора. В условиях лаборатории пробирку центрифугировали в течение 5 минут, для исследования использовали надосадочную жидкость в объеме 0,5 мл. Рабочий раствор крахмала с рН 7,0 готовился на основе фосфатно-щелочного буферного раствора и раствора крахмала 0,08г/100мл. Экспозиция 5 мл рабочего раствора крахмала и 0,5 мл биопробы проводилась в течение 30 минут в водяном термостате при температуре 37 °С. По истечении времени инкубации для остановки реакции ферментативного гидролиза в колбу вносили 1 мл 1N раствора соляной кислоты, 5 мл 0,01N раствора йода, доводили общий объем до 50 мл дистиллированной водой, определяли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 640 нм в кувете с толщиной слоя 10 мм. Контрольную пробу обрабатывали точно так же, как и опытную, но соляную кислоту прибавляли до внесения 0,5 мл биологического материала. Амилолитическую активность отделяемого влагалища выражали в мг/л·с (миллиграмм крахмала, гидролизованного 1 литром биологической жидкости за секунду инкубации при температуре 37 °С) и вычисляли по формуле:

$$A = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot \frac{4 \cdot 1000 \cdot 4,08}{30 \cdot 60 \cdot 0,02} = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot 453 \quad \frac{\text{мг}}{\text{л} \cdot \text{с}} \quad (1)$$

где:

E_k – оптическая плотность контрольной пробы; E_o – оптическая плотность опытной пробы; 4 – количество внесенного крахмала, содержащегося в 5 мл буферного раствора, представленное в мг; 30 – время инкубации в минутах; 0,02 – объем физиологической пробы в мл; 4,08 – коэффициент, учитывающий разведение пробы; 60 – коэффициент пересчета для представления времени инкубации в секундах.

Актуальность разработки способа определения амилолитической активности отделяемого влагалища была обоснована активно развивающейся в настоящее время концепцией патогенетической связи нарушения колонизационной резистентности половых путей с изменением ферментативного потенциала влагалища, определяющего биодоступность эпителиального гликогена, и формированием патогенными микроорганизмами устойчивой биопленки [Kalpana B.J. et al., 2012; Spear G.T. et al., 2014; Spear G.T., McKenna M., Landay A.L., 2015; Nasioudis D. et al., 2015; Machado D. et al., 2016; Hardy L. et al., 2016].

На **втором этапе** исследования в рамках предложенного алгоритма повышения результативности ЭКО в II и III ГС выполнялись следующие дополнительные мероприятия:

- определение индивидуальной вероятности наличия ЛДЖ у пациентки с помощью программы для ЭВМ **«Программа для прогнозирования наличия латентного дефицита железа у женщин репродуктивного возраста» (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2014614686)**. Алгоритм данной программы основан на определении вероятности наличия ЛДЖ с помощью следующего уравнения логистической регрессии:

$$p = \frac{e^{\text{beta}}}{1 + e^{\text{beta}}}, \text{ где } \text{beta} = E + 1,9657 \times A + 0,9302 \times B + 0,6111 \times C + 1,3433 \times D + 2,1402 \times I + 1,4563 \times F + 1,2242 \times G \quad (2)$$

Для определения значений предикторов представленного уравнения в ходе опроса пациентки на этапе прегравидарной подготовки уточнялись следующие данные: условия проживания (A=1 при наличии неудовлетворительных бытовых условий, в ином случае A=0); интенсивность занятий спортом (I=1 при наличии регулярных в течение года занятий спортом не менее 10 часов в неделю, в ином случае A=0); доля молочно-растительной пищи в рационе питания (F=1, если доля молочно-растительных продуктов составляет более 70% дневного рациона питания, в ином случае F=0); уровень потребления кофе (D=1 при употреблении более 28 чашек кофе в неделю, в ином случае D=0); частота простудных заболеваний (G=1 при частоте простудных заболеваний более 4 эпизодов в год, в ином случае G=0); количество беременностей в анамнезе (C, абсолютное число); длительность и обильность менструальных выделений (B=1 при длительности менструации более 5 дней и/или необходимости использования более 6 гигиенических прокладок в сутки, при наличии крупных сгустков и ограниченных по времени эпизодов во время менструации, требующих смены гигиенической прокладки каждый час в течение 3 часов подряд; в ином случае B=0).

- верификация ЛДЖ согласно данным определения СЖ, СФ, ТФ, подсчета КНТ;
- коррекция ЛДЖ при верификации диагноза на этапе прегравидарной подготовки – рекомендации по коррекции факторов образа жизни (снижение интенсивности спортивных тренировок, рациональное снижение массы тела, ограничение употребления танин-содержащих напитков, снижение доли молочно-растительной пищи при ее преобладании в рационе), а также назначение препарата железа протеин сукцинилата по 15 мл в день в течение 6 недель (регистрационный номер: П N013855/01 от 21.11.2007, код АТХ: B03AB09, производитель: Италфармако С.А., Испания);
- при выявлении дисбиоза влагалища на момент ПЭ или при регистрации клинической беременности – назначение таблеток деквалиния хлорида 10 мг (Мединова Лтд., Швейцария) вагинально ежедневно в течение 6 дней, на втором этапе – назначение пребиотика из растительных моносахаридов (регистрационный номер РЗН 2013/943 от 26.07.2013, производитель ООО «ИнБио», Российская Федерация) вагинально ежедневно в течение 14 дней.
- в качестве профилактики развития дисбиоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ в III_{II} ГС проводилось назначение пребиотика из растительных моносахаридов вагинально с 5 дня стимуляции суперовуляции в течение 14 дней.

Анализ данных выполнялся с помощью статистических пакетов SAS 9.3, STATISTICA 10, IBM-SPSS-22, StatPlus:mac Pro-6. При проверке нулевых гипотез критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 0,05. Для первичного анализа значимых закономерностей использовались дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни, анализ парных таблиц сопряженности с использованием критерия Пирсона χ^2 с поправкой Йетса, а также двустороннего точного критерия Фишера. Меры центральной тенденции количественных признаков характеризовались медианой и межквартильным размахом. Анализ взаимосвязи качественного признака, выступающего в роли результирующего показателя, с

подмножеством количественных и качественных переменных, проводился с помощью методов мультиномиальной и бинарной логистической регрессии с пошаговым алгоритмом включения и исключения предикторов.

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе исследования был проведен анализ основных клинических данных, выявляемых на этапе прегравидарной подготовки и в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ. Участники исследования были сопоставимы по возрасту: медиана возраста пациенток составила 34,0 (31,0–38,0) года и 33,0 (30,0–35,0) года в I и II ГС, соответственно ($p>0,05$); средние показатели возраста мужчин, состоявших в бесплодном браке, составили 36,0 (32,0–40,0) лет и 35,0 (32,0–38,0) лет в I и II ГС, соответственно ($p>0,05$). При изучении анамнеза экстрагенитальной патологии и негинекологических оперативных вмешательств значимых различий по частоте встречаемости и структуре определенных нозологий также выявлено не было. Значительную долю в структуре экстрагенитальной патологии составили случаи выявления у пациенток тромбофилии: 15,9% и 19,6% наблюдений в I и II ГС, соответственно ($p>0,05$). При сравнительном анализе анамнеза гинекологической патологии отмечено преобладание в изучаемой когорте пациенток рецидивирующего дисбиоза влагалища: 72,8% женщин I ГС, 62,7% женщин II ГС ($p>0,05$). Значительная доля в структуре гинекологической патологии была представлена наблюдениями хронического сальпингоофорита (49,2% пациенток I ГС и 41,8% пациенток II ГС, $p>0,05$), миомы матки (28,2% пациенток I ГС и 24,8% пациенток II ГС, $p>0,05$), хронического эндометрита (22,0% и 23,5% пациенток I и II ГС, соответственно, $p>0,05$). Согласно данным анамнеза перенесенных гинекологических операций, 37,9% пациенток I ГС и 35,2% пациенток II ГС ранее перенесли сальпингоовариолизис ($p>0,05$); о перенесенной тубэктомии сообщили 21,0% и 22,2% пациенток I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$); операции на яичниках перенесли 17,9% и 16,3% пациенток I и II ГС, соответственно ($p>0,05$). При анализе репродуктивной функции участниц исследования первичное бесплодие выявлено у 58% пациенток I ГС и 60,1% пациенток II ГС ($p>0,05$). При изучении акушерского анамнеза пациенток с вторичным бесплодием в ГС не было выявлено значимых различий по частоте потери самопроизвольной и индуцированной маточной беременности, эктопической беременности, а также медицинского аборта. Пациентки II ГС значимо чаще указывали на наличие родов живым плодом в результате самопроизвольной или индуцированной беременности в анамнезе: 5,6% и 12,4% живорождений в результате самопроизвольной беременности в I и II ГС, соответственно ($p<0,05$), 2,6% и 7,8% живорождений в результате ЭКО в I и II ГС, соответственно ($p<0,05$). Участники исследования были сопоставимы по длительности бесплодия и структуре факторов бесплодия. На момент наблюдения в I ГС бесплодие регистрировалось в течение 5,0 (3,0–8,0) лет, во II ГС – в течение 6,0 (4,0–9,0) лет ($p>0,05$). В изучаемой когорте пациентов в большинстве наблюдений отмечалось сочетание нескольких факторов бесплодия. Мужской фактор бесплодия выявлен у 63,0% и 69,9% пациентов I и II ГС, соответственно ($p>0,05$), трубно-перитонеальный фактор – у 52,8% и 50,3% пациенток I и II ГС, соответственно ($p>0,05$), ановуляторное бесплодие – у 31,7% и 37,9% пациенток I и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Бесплодие, ассоциированное с эндометриозом, выявлялось у 29,7% и 38,6% пациенток I и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Следует отметить, что 68 супружеских пар в ходе первичной консультации предоставили результаты ранее проведенного HLA-типирования по антигенам 1 и 2 класса, при этом

совпадение более 2 локусов было выявлено у 15,4% и 19,6% пациентов I и II ГС ($p>0,05$). При изучении основных исходных клинических данных участников исследования с помощью методов дескриптивной статистики мы также не выявили значимых различий в ГС по большинству анализируемых показателей. Медиана показателя индекса массы тела (ИМТ) у пациенток I ГС составила 22,49 (20,28–27,06) $\text{кг}/\text{м}^2$, у пациенток II ГС – 23,14 (20,42–26,13) $\text{кг}/\text{м}^2$, $p>0,05$. Значимых различий в ГС также не было выявлено и при сравнительном анализе уровней фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, пролактина, эстрадиола, тестостерона, кортизола, тиреотропного гормона, трийодтиронина, тироксина, дегидроэпиандростерон-сульфата, 17-оксипрогестерона, прогестерона. У пациенток I ГС регистрировались значимо более низкие показатели уровня антимюллерова гормона (АМГ): медиана АМГ составила 2,0 (2,0–3,0) нг/мл у пациенток I ГС и 3,0 (2,0–5,0) нг/мл у пациенток II ГС, соответственно ($p<0,05$). У 16,4% пациенток I ГС и 7,8% пациенток II ГС показатели АМГ находились в пределах 1–1,5 нг/мл, что соответствовало тенденции к снижению овариального резерва, при этом наличие данной тенденции также значимо чаще регистрировалось у пациенток I ГС. При сравнительном анализе показателей различных фондов обмена железа в исследуемых группах не было выявлено значимых различий, при этом меры центральной тенденции всех изучаемых показателей соответствовали референтным значениям. Частота выявления ЛДЖ в I и II ГС составила 32,8% и 22,9%, соответственно ($p=0,0547$). Общая распространенность ЛДЖ в изучаемой когорте составила 28,4%. Средние значения гематологических показателей у пациенток с ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки составили: эритроциты (RBC) – 3,9 (3,8–4,0) $\times 10^{12}$ /л, гемоглобин (Hb) – 124,2 (116,8–132,2) г/л, гематокрит (Ht) – 36,3 (35,8–36,7) %, СЖ – 11,2 (10,4–12,0) мкмоль/л, СФ – 19,6 (14,2–24,4) нг/мл, КНТ – 14,4 (12,2–16,6) %.

При сравнительном анализе параметров коагулограммы (международное нормализованное отношение, активированное частичное тромбопластиновое время, протромбин, тромбиновое время, фибриноген, Д-димер), а также распределения аллельных вариантов генов системы гемостаза на момент вступления в программу показатели пациенток I и II ГС были сопоставимы. При обследовании на этапе прегравидарной подготовки у 8,2% пациенток I ГС и 6,5% пациенток II ГС ($p>0,05$) впервые был диагностирован гиперкоагуляционный синдром. При последующем обследовании гематолога у 92,3% пациенток с выявленными в ходе первичного обследования отклонениями показателей коагулограммы (14 пациенток I ГС, 10 пациенток II ГС, $p>0,05$) была верифицирована тромбофилия, ассоциированная с наличием нескольких факторов тромбогенного риска. Таким образом, к моменту начала программы ЭКО и ПЭ общее число пациенток с верифицированной как ранее, так и впервые тромбофилией составило 85 человек: 23,1% пациенток I ГС и 26,1% пациенток II ГС ($p>0,05$). В каждом случае индивидуальная тактика коррекционных мероприятий в данной когорте пациенток была реализована специалистами по профилю выявленной патологии (гематолог, флеболог).

При сравнительном анализе частоты выявления при ультразвуковом исследовании патологии органов малого таза значимых различий в ГС выявлено не было. Миома матки (1-2 узла до 3 см) на этапе прегравидарной подготовки была диагностирована у 24,1% и 22,9% пациенток I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Сонографические признаки аденомиоза регистрировались у 10,2% и 11,1% пациенток I ГС и II ГС, соответственно

($p>0,05$). Частота выявления седловидной матки составила 6,6% и 9,8% в I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Пациентки первого этапа исследования были сопоставимы по основным показателям ультразвуковой морфометрии органов малого таза (длина матки, ширина матки, передне-задний размер матки, средний объем яичников), при этом у пациенток I ГС регистрировались значимо более низкие показатели общего числа антральных фолликулов: 16 (12–22) и 18 (16–22) в I ГС и II ГС, соответственно ($p<0,05$).

Сравнительный анализ клинических данных, выявляемых на этапах стимуляции суперовуляции, трансвагинальной пункции фолликулов, оплодотворения ооцитов, культивирования и переноса эмбрионов в полость матки, выявил основную часть показателей, дифференцирующих пациентов с различным исходом программы ЭКО и ПЭ. Стимуляция суперовуляции была произведена по короткому протоколу с антагонистами гонадолиберина у 82% и 76,5% пациенток I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Длинный протокол с агонистами гонадолиберина был использован в 18% и 23,5% наблюдений I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Пациентки I ГС и II ГС были сопоставимы по показателям суммарной дозы использованных при стимуляции суперовуляции менотропинов, α -фоллитропина, β -фоллитропина, триггера овуляции. Значимых различий также не было выявлено при сравнительном анализе параметров числа дней стимуляции суперовуляции, толщины эндометрия в день введения триггера овуляции, максимального и минимального диаметра фолликулов в день введения триггера овуляции. Толщина эндометрия в день введения триггера овуляции составила 9,5 (9,0–10,0) мм и 10,0 (9,0–11,0) мм в I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). У пациенток с отрицательным результатом этапа регистрации клинической беременности выявлялись значимо более низкие показатели числа зрелых ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции фолликулов: 6,0 (3,0–9,0) и 7,0 (4,0–12,0) в I ГС и II ГС, соответственно ($p<0,05$). При оплодотворении ооцитов у всех участников исследования использовалась нативная сперма супруга. На момент наблюдения участники исследования были сопоставимы по основным параметрам спермограммы. Концентрация прогрессивно-подвижных сперматозоидов более 10 млн/мл регистрировалась у 66% участников исследования. В соответствии с наличием показаний оплодотворение ооцитов методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида было осуществлено в 21,4% и 24,0% наблюдений I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Значимые различия в ГС были получены по показателю общего числа оплодотворенных ооцитов: 4,0 (2,0–6,0) и 5,0 (3,0–7,0) в I ГС и II ГС, соответственно ($p<0,05$). У пациентов II ГС регистрировались значимо более высокие показатели общего числа полученных эмбрионов: 5,0 (2,0–8,0) и 6,0 (4,0–9,0) в I ГС и II ГС, соответственно ($p<0,05$). Значимые различия также выявлены при исследовании показателя числа полученных эмбрионов хорошего качества (GQE): 1,0 (0,0–1,0) и 1,0 (1,0–2,0) в I ГС и II ГС, соответственно ($p<0,0001$). Медианы показателей числа перенесенных эмбрионов составили 2 (1–2) и 2 (1–2) в I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). Значимые различия были зарегистрированы при анализе показателя момента ПЭ: перенос эмбрионов в полость матки состоялся на вторые сутки у 29,2% и 19,6% пациентов I и II ГС, на третьи сутки – у 55,9% и 35,9% пациентов I и II ГС, на четвертые сутки – у 4,6% пациентов II ГС, на пятые сутки – у 14,9% и 39,8% пациентов I и II ГС, соответственно ($p=0,002$).

В соответствии с планом исследования в изучаемой когорте пациентов мы провели мониторинг состояния микроценоза влагалища на момент ПЭ и через 21 после ПЭ при регистрации клинической беременности. Общая частота регистрации дисбиоза влагалища (4-6 баллов Nugent, наличие ключевых клеток) на момент ПЭ в исследуемой когорте пациентов составила 12,6%, на 21 день после ПЭ – 10,3%. На момент ПЭ общее число наблюдений, не соответствующих критериям абсолютного нормоценоза влагалища, составило 36,4% в I ГС и 29,4% во II ГС, соответственно ($p>0,05$). На 21 день после ПЭ критериям абсолютного нормоценоза (0-3 балла Nugent) не удовлетворяли результаты 21% и 12,4% пациенток I и II ГС, соответственно ($p=0,0492$). Следует также отметить, что при отсутствии коррекции дисбиоза влагалища, выявленного на этапе ПЭ, частота регистрации патологического состояния вагинальной микробиоты на момент регистрации клинической беременности предположительно могла быть большей. У всех пациенток с выявленным при бактериоскопии дисбиозом влагалища первичный диагноз был верифицирован согласно данным ПЦР в реальном времени. Наиболее часто в качестве лидирующего компонента микроценоза влагалища на момент ПЭ выявлялись факультативно-анаэробные микроорганизмы (*Enterobacterium* spp.): 10/23 (43,5%) и 9/20 (45%) наблюдений в I и II ГС, соответственно. Смешанный тип дисбиоза влагалища на момент ПЭ регистрировался в 7/23 (30,4%) и 8/20 (40%) наблюдений I и II ГС, соответственно. При исследовании на 21 день после ПЭ преобладающим типом нарушения микроэкологии влагалища был смешанный аэробно-анаэробный дисбиоз: 16/26 (61,5%) и 5/10 (50%) наблюдений I и II ГС, соответственно. Результаты изучения амилалитической активности влагалища на момент ПЭ представлены на рисунке 1. Показатели амилалитической активности отделяемого влагалища на момент ПЭ у пациенток с различным исходом программы были сопоставимы: 40 (22–63) мг/с·л и 36 (18–58) мг/с·л в I ГС и II ГС, соответственно ($p>0,05$). У пациенток с установленным на момент ПЭ дисбиозом влагалища (43 пациентки) регистрировались значимо более низкие показатели амилалитической активности вагинального отделяемого: 27 (13–37) мг/с·л и 40 (22–63) мг/с·л при наличии дисбиоза (43/348) и нормоценоза влагалища (305/348), соответственно ($p=0,002$). Следует отметить, что активность тканевых амилалитических ферментов, определяющая биодоступность эпителиального гликогена, в настоящее время рассматривается в качестве одного из факторов колонизационной резистентности репродуктивного тракта. Пероксид-продуцирующие штаммы *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, наиболее часто выявляемые в качестве доминирующих представителей микроценоза влагалища, не обладают способностью ферментировать гликоген, демонстрируют умеренный рост в среде мальтодекстрина и хорошо культивируются при наличии мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров глюкозы [Martín R. et al., 2008; Spear G.T. et al., 2014]. Полученные в нашем исследовании данные подтверждают активно развивающуюся концепцию механизма колонизационной резистентности влагалища, основанную на тонкой взаимосвязи процессов десквамации и лизиса эпителиальных клеток с последующим гидролизом свободного гликогена под действием различных изоформ α -амилазы, кислой α -глюкозидазы и глюкоамилазы влагалищного отделяемого [Spear G.T., McKenna M., Landay A.L., 2015; Nasioudis D. et al., 2015]. Полученные данные

также являются патогенетическим обоснованием эффективности профилактики дисбиоза влагалища с помощью пребиотиков, содержащих олиго- и моносахариды.

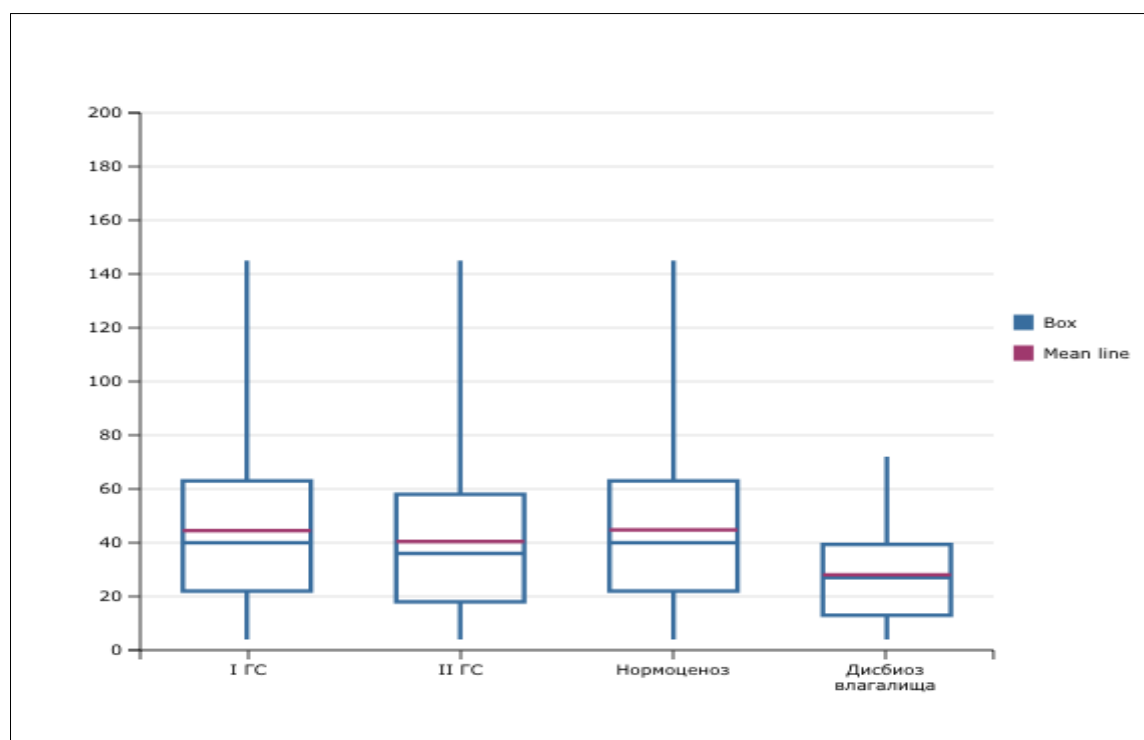


Рисунок 1. Данные исследования амилалитической активности отделяемого влагалища (мг/л·с) на момент ПЭ у пациенток в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ

Результирующая интегративная оценка прогностической значимости клинических данных, выявляемых на этапе прегравидарной подготовки и в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ, была проведена на первом этапе исследования с помощью методов мультиномиальной и бинарной логистической регрессии. В таблице 1 представлена характеристика предикторов уравнения мультиномиальной логистической регрессии для прогнозирования результативности метода ЭКО.

Таблица 1 – Математическая модель прогнозирования результативности программы ЭКО по исходным клиническим данным

Предиктор	Коэффициент регрессии	SE	Wald χ^2	p	ОШ (95% ДИ)
Интерсепт (А)	-2,2689	0,9096	6,2225	0,0126	-
Интерсепт (В)	-1,7234	0,9057	3,6207	0,0571	-
Интерсепт (С)	-1,6529	0,9053	3,3336	0,0679	-
Возраст пациентки	0,0616	0,0278	4,9137	0,0266	1,064 (1,007–1,123)
Роды живым плодом в результате самопроизвольной беременности в анамнезе	-0,7178	0,3429	4,3831	0,0363	0,488 (0,249–0,955)
АМГ менее 1,5 нг/мл	0,9512	0,2789	11,6343	0,0006	2,589 (1,499–4,472)

В качестве зависимой переменной рассматривался исход программы ЭКО, представленный следующими градациями: отсутствие беременности, потеря беременности

до 12 недель, потеря беременности после 12 недель, роды живым плодом. Прогностическая значимость клинических параметров, являющихся предикторами полученного уравнения логистической регрессии, интерпретируется согласно показателю отношения шансов (ОШ) и 95% доверительному интервалу (ДИ) для ОШ. Согласно представленным данным, значимыми предикторами, имеющими обратную корреляцию с положительной вероятностью наступления и пролонгирования индуцированной беременности, являются возраст пациентки и уровень АМГ. Наличие в анамнезе живорождения в результате самопроизвольной беременности является благоприятным прогностическим фактором, значимо повышающим вероятность успешной реализации программы ЭКО и ПЭ. Показатель конкордантности (процент верных отнесений) для представленной модели составил 59%, показатель D Зоммера – 0,217.

В таблице 2 представлена характеристика предикторов уравнения бинарной логистической регрессии для прогнозирования отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ на основе данных, выявляемых на этапе прегравидарной подготовки. Согласно полученным данным, выявлена значимая взаимосвязь отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ с параметрами возраста пациентки, уровня АМГ, наличия седловидной матки (прямая связь), а также передне-заднего размера матки (слабая обратная связь).

Таблица 2 – Математическая модель прогнозирования отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ по исходным клиническим данным

Предиктор	Коэффициент регрессии	SE	Wald χ^2	p	ОШ (95% ДИ)
Интерсепт	-1,4713	1,0709	1,8877	0,1695	
Возраст пациентки, лет (А)	0,0863	0,0316	7,4598	0,0063	1,090 (1,025–1,160)
Передне-задний размер матки, мм (В)	-0,0461	0,0216	4,5344	0,0332	0,955 (0,915–0,996)
АМГ менее 1,5 нг/мл (С)	0,9407	0,2886	10,6258	0,0011	2,562 (1,455–4,510)
Седловидная матка (D)	0,8427	0,4174	4,0760	0,0435	2,323 (1,025–5,263)

В соответствии с представленными данными, вероятность отсутствия беременности в предстоящей попытке ЭКО и ПЭ вычисляется по следующей формуле:

$$p = \frac{\exp(beta)}{1 + \exp(beta)}, \text{ где } beta = -1,4713 + 0,0863 \times A - 0,0461 \times B + 0,9407 \times C + 0,8427 \times D \quad (3)$$

Используемые для расчетов согласно представленной формуле показатели «А» и «В» являются абсолютными числами, показатели «С» и «D» принимают значение «0» и «1» при отсутствии и наличии обозначаемого признака, соответственно. Показатель конкордантности представленной математической модели составил 65,5%, показатель AUC (площадь под ROC-кривой) составил 0,65, что свидетельствует об удовлетворительном качестве прогностической модели. Чувствительность и специфичность в точке отсечения 0,50 составили 54,6% и 72,5%, соответственно.

Принимая во внимание ограниченную прогностическую мощность алгоритмов, основанных на анализе данных этапа прегравидарной подготовки, на следующем этапе обработки данных мы включили в подмножество потенциальных предикторов наступления индуцированной беременности клинические параметры, выявляемые в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ. В таблице 3 представлена характеристика предикторов уравнения бинарной логистической регрессии (формула 4) для прогнозирования отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ на основе данных, выявляемых на этапе прегравидарной подготовки и в ходе реализации программы. Согласно представленным данным, значимым предиктором отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ является наличие у пациентки ЛДЖ. Число GQE и момент ПЭ демонстрируют прямую взаимосвязь с успешным результатом этапа регистрации клинической беременности. Используемый для вычислений показатель «А» является абсолютным числом, соответствующим числу GQE; показатель «В» принимает значения «0» или «1» при отсутствии и наличии ЛДЖ, соответственно; показатель «С» принимает целочисленные значения от «1» до «4» при ПЭ на вторые, третьи, четвертые и пятые сутки, соответственно. Процент верных отнесений для представленного алгоритма составил 71,8%, показатель AUC – 0,75, что соответствует хорошему качеству модели. Чувствительность и специфичность в точке отсечения 0,69 составили 54,6% и 86,1%, соответственно.

Таблица 3 – Математическая модель прогнозирования отсутствия клинической беременности в результате ЭКО и ПЭ по исходным клиническим данным и данным реализации программы

Предиктор	Коэффициент регрессии	SE	Wald χ^2	p	ОШ (95% ДИ)
Интерсепт	2,5062	0,5054	24,5936	<0,0001	-
Число полученных эмбрионов хорошего качества (А)	-0,7021	0,1724	16,5745	<0,0001	0,496 (0,353–0,695)
ЛДЖ у пациентки (В)	0,7479	0,3535	4,4761	0,0344	2,112 (1,057–4,224)
Момент переноса эмбрионов в полость матки (С)	-0,4922	0,1282	14,7391	0,0001	0,611 (0,475–0,786)

$$p = \frac{\exp(beta)}{1 + \exp(beta)}, \text{ где } beta = 2,5062 - 0,7021 \times A + 0,7479 \times B - 0,4922 \times C \quad (4)$$

Принимая во внимания высокую прогностическую значимость параметра числа GQE, мы построили отдельную математическую модель для прогнозирования данного аспекта результативности ЭКО и ПЭ (таблица 4, формула 5). Для вычислений согласно представленному уравнению показатели «А» и «С» принимают значение «0» и «1» при отсутствии и наличии обозначаемого признака, соответственно. Показатель «В» соответствует абсолютному числу полученных ооцитов. Согласно полученным данным, наиболее значимые предикторы результативности эмбриологического этапа программы ЭКО и ПЭ (наличие бесплодия, ассоциированного с эндометриозом и самопроизвольной беременности в анамнезе) могут быть выявлены на этапе прегравидарной подготовки. Параметр количества полученных ооцитов, регистрируемый на этапе пункции

фолликулов, демонстрирует наименьшую прогностическую значимость. Процент верных отнесений для данного уравнения бинарной логистической регрессии составил 65,5%, показатель AUC составил 0,70, что соответствует хорошему качеству модели. Чувствительность и специфичность в точке отсечения 0,50 составили 64,7% и 66,3%, соответственно.

Таблица 4 – Математическая модель прогнозирования наличия эмбрионов хорошего качества в программе ЭКО и ПЭ

Предиктор	Коэффициент регрессии	SE	Wald χ^2	p	ОШ (95% ДИ)
Интерсепт	-0,90	0,40	5,07	0,02	-
Самопроизвольная беременность в анамнезе (А)	0,85	0,34	6,28	0,01	2,33 (1,20–4,52)
Количество полученных ооцитов (В)	0,08	0,03	7,82	0,01	1,09 (1,03–1,15)
Бесплодие, ассоциированное с эндометриозом (С)	-0,79	0,34	5,35	0,02	0,45 (0,23–0,89)

$$p = \frac{\exp(beta)}{1 + \exp(beta)}, \text{ где } beta = -0,90 + 0,85 \times A + 0,08 \times B - 0,79 \times C \quad (5)$$

В таблице 5 представлена характеристика предикторов уравнения бинарной логистической регрессии для прогнозирования завершения программы ЭКО родами живым плодом (формула 6).

Таблица 5 – Математическая модель прогнозирования завершения индуцированной беременности родами живым плодом

Предиктор	Коэффициент регрессии	SE	Wald χ^2	p	ОШ (95% ДИ)
Интерсепт	-2,0097	0,4942	16,5352	<0,0001	
Число полученных эмбрионов хорошего качества (А)	0,6335	0,1642	14,8828	0,0001	1,884 (1,366–2,599)
Тромбофилия у пациентки (В)	-0,7315	0,3473	4,4366	0,0352	0,481 (0,244–0,950)
Совпадение более 2 локусов системы HLA в супружеской паре (С)	-0,8102	0,3858	4,4093	0,0357	0,445 (0,209–0,910)
Момент переноса эмбрионов в полость матки (D)	0,3186	0,1292	6,0834	0,0136	1,375 (1,068–1,771)

$$p = \frac{\exp(beta)}{1 + \exp(beta)}, \text{ где } beta = -2,0097 + 0,6335 \times A - 0,7315 \times B - 0,8102 \times C + 0,3186 \times D \quad (6)$$

Для вычислений согласно представленному уравнению показатели «В» и «С» принимают значение «0» и «1» при отсутствии и наличии обозначаемого признака, соответственно. Показатель «А» соответствует абсолютному числу GQE. Показатель «D» принимает целочисленные значения от «1» до «4» при ПЭ на вторые, третьи, четвертые и

пятые сутки, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о значимой взаимосвязи факторов совпадения более 2 локусов системы HLA в супружеской паре и наличия тромбофилии у пациентки с отсутствием живорождения в результате ЭКО и ПЭ. Также выявлена прямая взаимосвязь вероятности рождения живого ребенка в результате ЭКО и ПЭ с параметрами числа GQE и момента ПЭ. Показатель конкордантности полученного уравнения составил 70,1%, показатель AUC – 0,73, что соответствует хорошему качеству прогностического алгоритма. Чувствительность и специфичность в точке отсечения 0,35 составили 60,6% и 80,2%, соответственно.

Согласно итогам первого этапа нашего исследования, при расширении базового спектра диагностических мероприятий выявляются следующие управляемые клинические факторы, определяющие результативность программы: ЛДЖ у пациентки, верифицированный на этапе прегравидарной подготовки, и дисбиоз влагалища, регистрируемый после начала стимуляции суперовуляции. На **втором этапе** исследования мы оценили возможность повышения результативности метода ЭКО и ПЭ с помощью выявления и коррекции ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки, а также профилактики и раннего выявления дисбиоза влагалища в ходе реализации программы. Участницы второго этапа исследования были сопоставимы по основным исходным клинико-анамнестическим данным. Средние показатели возраста пациенток составили 27 (26–28) лет, 29 (26–31) лет, 27 (26–31) лет в I_{II} ГС, II_{II} ГС и III_{II} ГС, соответственно ($p>0,05$). На момент наблюдения бесплодие регистрировалось в течение 3(2–3) лет у пациенток I_{II} ГС, в течение 3 (2–5) лет – у пациенток II_{II} ГС, в течение 3 (2–5) лет у пациенток III_{II} ГС ($p>0,05$). Участники второго этапа исследования также были сопоставимы по числу самопроизвольных беременностей и родов в анамнезе: в I_{II} ГС данные показатели составили 1(0–2) и 0 (0–1), соответственно, во II_{II} ГС – 1(0–2) и 0(0–0), в III_{II} ГС – 1 (0–1) и (0–0), соответственно ($p>0,05$ при сравнении соответствующих показателей в ГС). Средние уровни АМГ составили 3,4 (3,2–3,5) нг/мл у пациенток I_{II} ГС, 3,4 (2,8–3,5) нг/мл во II_{II} ГС, 3,4 (3,0–3,5) нг/мл в III_{II} ГС, соответственно ($p>0,05$). На этапе прегравидарной подготовки ЛДЖ был верифицирован и скорректирован у 32,5% и 31,2% пациенток II_{II} ГС и III_{II} ГС, соответственно ($p>0,05$). На этапе стимуляции суперовуляции у всех участниц исследования использовался короткий протокол с антагонистами гонадолиберина. Значимых различий в суммарной дозе препаратов, количестве дней стимуляции, параметрах фолликулометрии в ГС выявлено не было. Средние показатели общего числа полученных эмбрионов составили 6 (4–9), 5 (4–10), 5 (4–9) в I_{II} ГС, II_{II} ГС и III_{II} ГС, соответственно ($p>0,05$). Медианы показателей числа GQE составили 2 (0–3), 1 (0–3), 2 (0–3) в I_{II} ГС, II_{II} ГС и III_{II} ГС, соответственно ($p>0,05$). Перенос эмбрионов в полость матки проводился на пятые сутки культивирования у всех участников исследования. Микроскопическое исследование отделяемого влагалища в соответствии с планом исследования проводилось на момент ПЭ (II_{II} ГС и III_{II} ГС) и на момент регистрации клинической беременности (I_{II} ГС, II_{II} ГС и III_{II} ГС). В III_{II} ГС состояние влагалищной микрофлоры при исследовании на 21 день после ПЭ соответствовало критериям абсолютного нормоценоза у 85,7% (66/77) пациенток, дисбиоз влагалища был выявлен в 3,9% наблюдений (3/77). У пациенток II_{II} ГС, в отсутствие превентивной поддержки колонизационной резистентности влагалища, через 21 день после ПЭ дисбиоз влагалища регистрировался значимо чаще: 15% наблюдений (12/80), $p_{II,III}<0,05$. В отсутствие

диагностики и лечения ЛДЖ у пациентки на этапе прегравидарной подготовки, а также мониторинга и коррекции микроценоза влагалища в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ (I_{II} ГС) частота выявления дисбиоза влагалища на 21 день после ПЭ составила 19,5% (16/82), что значимо превышало показатели II_{II} и III_{II} ГС, при этом дисбиоз влагалища значимо чаще выявлялся у пациенток с отсутствием клинической беременности (у 15 из 16 пациенток I_{II} ГС с дисбиозом влагалища на 21 день после ПЭ регистрировалось отсутствие беременности, $p=0,0401$). Согласно полученным данным, развитие дисбиоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ является значимым управляемым предиктором отсутствия клинической беременности. Частота регистрации клинической беременности составила 30,5% (25/82) у пациенток I_{II} ГС, 47,5% (38/82) во II_{II} ГС, 51% (39/77) в III_{II} ГС ($p_{I,II}=0,0396$; $p_{I,III}=0,0158$). При изучении структуры осложнений индуцированной гестации у пациенток III_{II} ГС регистрировались значимо более низкие показатели частоты дисбиоза влагалища (36% и 10,2% наблюдений клинической беременности I_{II} и III_{II} ГС, соответственно, $p<0,05$), а также угрозы прерывания беременности (68% и 38,5% наблюдений I_{II} и III_{II} ГС, соответственно, $p<0,05$). Изучение данных об исходе индуцированной беременности не выявило значимых различий в ГС по частоте потери беременности и родов в зависимости от срока гестации, однако при расчете соответствующих показателей относительно исходного числа пациенток в группах (на момент ПЭ) значимые различия по показателю частоты завершения программы ЭКО и ПЭ срочными родами живым плодом также были отмечены у пациенток I_{II} и III_{II} ГС и составили 15,8% и 37,6%, соответственно ($p<0,05$). Таким образом, в рамках проспективного сравнительного исследования была доказана клиническая эффективность реализованного нами алгоритма повышения результативности ЭКО, включающего диагностику и коррекцию ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки пациентки с последующим мониторингом и профилактикой нарушений микроценоза влагалища путем назначения пребиотика из растительных моносахаридов на этапе стимуляции суперовуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования (выводы):

1. На этапе прегравидарной подготовки супружеской пары в качестве значимых клинических предикторов результативности ЭКО и ПЭ следует рассматривать возраст пациентки (ОШ 1,09, 95% ДИ 1,02–1,16 при прогнозе отсутствия клинической беременности), наличие в анамнезе пациентки самопроизвольной беременности и родов живым плодом (ОШ 0,49, 95% ДИ 0,25–0,96 при прогнозе отсутствия клинической беременности), передне-задний размер матки (ОШ 0,96, 95% ДИ 0,92–0,99 при прогнозе отсутствия клинической беременности), наличие седловидной матки (ОШ 2,32, 95% ДИ 1,03–5,26 при прогнозе отсутствия клинической беременности), уровень АМГ менее 1,5 нг/мл (ОШ 2,56, 95% ДИ 1,45–4,51 при прогнозе отсутствия клинической беременности), наличие бесплодия, ассоциированного с эндометриозом (ОШ 0,45, 95% ДИ 0,23–0,89 при прогнозе наличия эмбрионов хорошего качества), наличие тромбофилии у пациентки (ОШ 0,481, 95% ДИ 0,244–0,950 при прогнозе родов живым плодом), совпадение более двух локусов системы HLA в супружеской паре (ОШ 0,445, 95% ДИ 0,209–0,910 при прогнозе родов живым плодом).

2. Распространенность ЛДЖ у пациенток, состоящих в бесплодном браке, составляет 28,4%. Наличие ЛДЖ является независимым управляемым предиктором отсутствия клинической беременности в программе ЭКО и ПЭ (ОШ 2,112, 95% ДИ 1,057–4,224).
3. В ходе реализации программы ЭКО и ПЭ регистрируются следующие основные факторы, определяющие индивидуальную вероятность благоприятного исхода: общее число ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции фолликулов (ОШ 1,09, 95% ДИ 1,03–1,15 при определении вероятности наличия эмбрионов хорошего качества), число полученных эмбрионов хорошего качества (ОШ 1,884, ДИ 1,366–2,599 при определении вероятности завершения индуцированной беременности родами живым плодом), момент переноса эмбрионов в полость матки (ОШ 1,375, 95% ДИ 1,068–1,771 при определении вероятности завершения индуцированной беременности родами живым плодом).
4. В отсутствие коррекционных мероприятий в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ частота выявления дисбиоза влагалища на момент ПЭ составляет 12,6%, на 21 день после ПЭ – 19,5%. У пациенток с установленным на момент ПЭ дисбиозом влагалища регистрируются значимо более низкие показатели амилалитической активности вагинального отделяемого: 27 (13–37) мг/с·л и 40 (22–63) мг/с·л при наличии дисбиоза и нормоценоза влагалища, соответственно ($p=0,002$). Развитие дисбиоза влагалища в ходе реализации программы ЭКО и ПЭ является значимым управляемым предиктором отсутствия клинической беременности (ОШ 1,375, 95% ДИ 1,068–1,771).
5. На этапе прегравидарной подготовки супружеской пары возможно определение индивидуальной вероятности наступления беременности в результате ЭКО и ПЭ с использованием параметров возраста, морфометрической характеристики матки и характеристики овариального резерва пациентки с точностью 65,5%, чувствительностью и специфичностью 54,6% и 72,5%, соответственно. На основании данных о наличии тромбофилии у пациентки на этапе прегравидарной подготовки, совпадения более 2 локусов системы HLA в супружеской паре, количества полученных эмбрионов хорошего качества и момента ПЭ возможно определение вероятности завершения программы ЭКО и ПЭ родами живым плодом с точностью 70,1%, чувствительностью и специфичностью 60,6% и 80,2%, соответственно.
6. В результате персонифицированной диагностики и коррекции латентного дефицита железа на этапе прегравидарной подготовки пациентки частота регистрации клинической беременности у пациенток выше в 1,56 раза, чем при отсутствии дополнительных мероприятий ($p=0,0396$). На фоне выявления и коррекции латентного дефицита железа на этапе прегравидарной подготовки с проведением профилактики дисбиоза влагалища назначением пребиотика из растительных моносахаридов в цикле стимуляции суперовуляции частота регистрации клинической беременности у пациенток выше в 1,67 раза, чем при отсутствии дополнительных мероприятий ($p=0,0158$) и в 1,2 раза, чем при коррекции латентного дефицита железа без профилактики дисбиоза влагалища.

Практические рекомендации

1. На этапе подготовки пациенток к ЭКО и ПЭ рекомендуется осуществлять определение индивидуальной вероятности наличия ЛДЖ на основании интегративной оценки факторов анамнеза и образа жизни с использованием программы для ЭВМ № 2014614686

«Программа для прогнозирования наличия латентного дефицита железа у женщин репродуктивного возраста».

2. При определении высокой вероятности наличия ЛДЖ план обследования пациентки на этапе прегравидарной подготовки необходимо дополнить определением следующих гематологических показателей и индикаторов обмена железа: RBC, Hb, Ht, CЖ, СФ, КНТ.
3. Рекомендуемая тактика коррекции ЛДЖ на этапе прегравидарной подготовки заключается в коррекции факторов образа жизни и пищевого поведения, а также включает назначение перорально препарата железа протеин сукцинилата по 15 мл в день в течение 6 недель под контролем лабораторных показателей накануне ПЭ.
4. С целью профилактики нарушений микроценоза влагалища с 5 дня контролируемой стимуляции суперовуляции в программе ЭКО и ПЭ рекомендуется назначение пребиотика из растительных моносахаридов вагинально в течение 14 дней.
5. С целью раннего выявления и коррекции дисбиоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ целесообразно проводить дополнительно микроскопическое исследование отделяемого влагалища на момент ПЭ, а также на 21 день после ПЭ (на момент регистрации клинической беременности при ультразвуковом исследовании).
6. При выявлении согласно данным микроскопии промежуточного типа микроценоза влагалища рекомендуется назначение пребиотика из растительных моносахаридов вагинально в течение 14 дней с последующей повторной оценкой состояния микроценоза влагалища.
7. При выявлении дисбиоза влагалища в программе ЭКО и ПЭ назначается стандартная двухэтапная коррекционная терапия, этап восстановления индигенной микрофлоры при этом также рекомендуется проводить с помощью назначения пребиотика из растительных моносахаридов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проблема повышения результативности лечения бесплодия методом ЭКО и ПЭ с помощью выявления и коррекции управляемых клиничко-прогностических факторов является приоритетным направлением современной репродуктологии. Перспективным и наименее разработанным направлением данной темы является изучение механизма взаимосвязи динамических аспектов состояния микробиома репродуктивного тракта и результативности различных этапов реализации программы ЭКО и ПЭ. Разработка патогенетически обоснованной стратегии сохранения колонизационной резистентности половых путей пациентки на этапах прегравидарной подготовки, наступления и пролонгирования индуцированной беременности является резервом повышения эффективности лечения бесплодия с помощью ВРТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности клинической диагностики латентного дефицита железа у женщин с трубным бесплодием [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина, С.А. Скворчевская [и др.] // Междунар. научно-исследовательский журнал. – 2014. – № 3(22), Ч. 4. – С. 106.
2. Зазулина, Я.А. Прогностическая значимость модели Темплтона в оценке результативности метода экстракорпорального оплодотворения [Текст] / Я.А. Зазулина // Аспирантские чтения – 2014. Материалы Всерос. конф. с междунар. участием «Молодые ученые 21 века – от современных технологий к инновациям». – Самара, 2014. – С. 184–185.
3. Самыкина, О.В. Частота наступления беременности у пациенток с трубно-

перитонеальным бесплодием в программах ЭКО на фоне коррекции латентного дефицита железа [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина // VIII междунар. конгр. по репродуктивной медицине. Сб. тез. – М., 2014. – С. 258–259.

4. Самыкина, О.В. Возможности клинической диагностики латентного дефицита железа у женщин с трубным бесплодием на амбулаторно-поликлиническом этапе [Текст] / О.В. Самыкина, В.А. Мельников, Я.А. Зазулина // Юбилейный Всерос. конгр. с междунар. участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь – в эпицентре женского здоровья». Сб. тез. – М., 2014. – С. 255–257.

5. Самыкина, О.В. Клинические аспекты течения беременности, полученной методом ЭКО, на фоне латентного дефицита железа [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина, С.А. Скворчевская // Бюл. Северного государственного медицинского университета. – 2014. – № 1, (вып. XXXII). – С. 132–133.

6. Самыкина, О.В. Оптимизация подготовки пациенток с бесплодием и железодефицитным состоянием к процедуре ЭКО [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина, С.А. Скворчевская // Медицинская наука: взгляд в будущее: материалы II межрег. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2014. – С. 372–375.

7. Самыкина, О.В. Особенности наступления беременности в программах ЭКО при наличии железодефицитного состояния [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина, С.А. Скворчевская // Теоретические и прикладные исследования в области естественных и гуманитарных наук. Всерос. научно-практ. конф.: сб. науч. тр. / под ред. Л.И. Меньшиковой, А.Н. Ходусова, О.А. Затеякина [и др.]. – Прокопьевск, 2014. – С. 7–11.

8. Самыкина, О.В. Стратегия повышения результативности экстракорпорального оплодотворения у женщин с трубным бесплодием и латентным дефицитом железа в условиях центра вспомогательной репродукции [Текст] / О.В. Самыкина, Я.А. Зазулина, С.А. Скворчевская // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье: Тез. XVII Всерос. медико-биологической конф. молодых исследователей. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014. – С. 387–388.

9. Калинкина, О.Б. Диагностика и противорецидивная терапия генитального эндометриоза при подготовке к реализации вспомогательных репродуктивных технологий [Текст] / О.Б. Калинкина, Я.А. Зазулина, Г.М. Сресели [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Том 16, №5 (4). – С. 1449–1452.

10. Зазулина, Я.А. Возможности прогнозирования ранних потерь беременности, индуцированной в результате экстракорпорального оплодотворения [Текст] / Я.А. Зазулина // Аспирантские чтения – 2015. Материалы Всерос. конф. с междунар. участием «Молодые ученые 21 века – от идеи к практике». – Самара, 2015. – С. 116–117.

11. Зазулина, Я.А. Многофакторный анализ предикторов результативности метода экстракорпорального оплодотворения на этапе имплантации эмбриона [Текст] / Я.А. Зазулина, О.В. Самыкина, В.А. Мельников // Известия Самарского научного центра РАН. – 2015. – Том 17, №2 (2). – С. 304–309.

12. Зазулина, Я.А. Возможности прогнозирования успешного исхода программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона [Текст] / Я.А. Зазулина, О.В. Самыкина, В.А. Мельников [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-5. – С. 941–945.

13. Зазулина, Я.А. Дифференцированная оценка предикторов результативности метода экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона [Электронный ресурс] / Я.А. Зазулина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=18768>, свободный. – Загл. с экрана. – (дата обращения 02.01.2017).
14. Зазулина, Я.А. Первый российский опыт клинической апробации алгоритма Темплтона в условиях центра вспомогательных репродуктивных технологий [Текст] / Я.А. Зазулина, М.В. Комарова, В.А. Мельников // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Том 17, №5 (3). – С. 773-779.
15. Зазулина, Я.А. Возможности прогнозирования результата программы экстракорпорального оплодотворения на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары [Текст] / Я.А. Зазулина // Аспирантский вестник Поволжья. – 2016. – № 1-2. – С. 17-20.

АВТОРСКИЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА

1. Программа для прогнозирования наличия латентного дефицита железа у женщин репродуктивного возраста [Текст]: свидетельство о гос. рег. программы для ЭВМ № 2014614686 / В.А. Мельников, О.В. Самыкина, С.А. Скворчевская, А.Н. Маркелова, Я.А. Зазулина, С.А. Рябова; ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. – дата рег.: 06.05.2014; номер и дата поступления заявки: 2014612882 03.04.2014; опублик. 20.06.14; Реестр программ для ЭВМ. – 1 с.
2. Способ определения амилалитической активности отделяемого влагалища [Текст]: рационализаторское предложение / В.А. Мельников, И.Л. Глазко, Я.А. Зазулина; выдано ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» 15.12.2016г., № 374.

Список сокращений

АМГ – антимюллеров гормон
 ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
 ГС – группа сравнения
 ДИ – доверительный интервал
 ИМТ – индекс массы тела
 КНТ – коэффициент насыщения трансферрина железом
 ЛДЖ – латентный дефицит железа
 ОШ – отношение шансов
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ПЭ – перенос эмбрионов в полость матки
 РАРЧ – Российская ассоциация репродукции человека
 СЖ – сывороточное железо
 СФ – сывороточный ферритин
 ТФ – трансферрин
 ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
 AUC – area under curve, площадь под ROC-кривой
 GQE – good quality embryos – эмбрионы хорошего качества
 Hb – hemoglobin, гемоглобин
 HLA – human leukocyte antigens, главный комплекс гистосовместимости
 Ht – hematocrit, гематокрит
 RBC – эритроциты