

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПО МИКРОБНОМУ СОСТАВУ ЭЯКУЛЯТА

Е. А. Паначева², Е. В. Кудрявцева¹, Д. Л. Зорников¹, Е. Э. Плотко², В. М. Петров¹, Е. С. Ворошилина^{1,2}✉

¹ Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Один из ключевых факторов наступления беременности при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) — получение достаточного количества эмбрионов хорошего и отличного качества. Целью работы было разработать математическую модель для прогнозирования качества получаемых эмбрионов на основании результатов оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ при нормозооспермии. Эякулят 127 мужчин использовали в процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В зависимости от доли бластоцист хорошего и отличного качества, сформировавшихся на 5-й день культивирования (good-quality blastocyst development rate, GBDR), пациенты были разделены на две группы. В первую включены 57 пациентов с GBDR \geq 40%, во вторую — 70 пациентов с GBDR $<$ 40%. Всем пациентам в день оплодотворения проведено исследование параметров спермограммы по стандарту ВОЗ и определен состав микробиоты эякулята методом количественной ПЦР в реальном времени. С помощью дискриминантного анализа разработан способ прогнозирования эффективности эмбриологического этапа ВРТ у пар, планирующих процедуру ЭКО, при показателях эякулята, соответствующих критериям нормозооспермии, с расчетом прогностического индекса «Эмбрионы хорошего и отличного качества. Прогноз нормозооспермия» (ЭХО-Про-N). Если значение ЭХО-Про-N $>$ 0,212, вероятность получения GBDR \geq 40% низкая, если ЭХО-Про-N \leq 0,212, вероятность высокая. Показатели чувствительности и специфичности составили соответственно 71,9% и 70,0%, эффективность способа — 70,9%. Разработанная прогностическая модель дает возможность прогнозирования получения GBDR \geq 40% на основании комплексной оценки микробиоты эякулята.

Ключевые слова: микробиота эякулята, прогнозирование, эффективность ВРТ, ЭКО, ПЦР в реальном времени, дискриминантный анализ

Благодарности: авторы благодарят директора Медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург) В. Н. Хаятина за возможность выполнения исследования на базе центра.

Вклад авторов: Е. А. Паначева — организация исследования, отбор пациентов, выполнение ПЦР-РВ, анализ полученных данных, написание статьи; Е. В. Кудрявцева, Д. Л. Зорников — статистическая обработка, анализ полученных данных, написание статьи; Е. Э. Плотко, В. М. Петров — анализ полученных данных, написание статьи; Е. С. Ворошилина — организация исследования, выполнение ПЦР-РВ, анализ полученных данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 20 сентября 2019 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие. Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Тверитина, д. 16, г. Екатеринбург, 620100, Россия; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 23.03.2023 **Статья принята к печати:** 14.04.2023 **Опубликована онлайн:** 26.04.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.015

PREDICTING THE BLASTOCYST DEVELOPMENT RATE DURING ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES BASED ON SEMEN MICROBIOTA

Panacheva EA², Kudryavtseva EV¹, Zornikov DL¹, Plotko EE², Petrov VM¹, Voroshilina ES^{1,2}✉

¹ Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

Obtaining enough good and excellent quality embryos is one of the key factors for achieving pregnancy using assisted reproductive technologies. This work was aimed at developing a mathematical model for predicting good and excellent quality embryos based on semen microbiota assessment in normozoospermia. The study included 127 men whose semen was used for in vitro fertilization (IVF). Patients were divided into 2 groups depending on the proportion of good-quality blastocyst developed on the 5th day of culturing (good-quality blastocyst development rate, GBDR). The 1st group included 57 patients with GBDR \geq 40%, the 2nd group included 70 patients with GBDR $<$ 40%. All patients' semen was assessed at the day of fertilization. Semen parameters were evaluated in accordance with the WHO standards and semen microbiota composition was determined by means of real-time PCR. Discriminant analysis was used for development of the prognostic model. We developed a method for predicting efficiency of the embryological IVF stage in normozoospermia: EGO-Pro-N prognostic index (Embryos of GOod and Excellent quality Prognosis in Normozoospermia). If the EGO-Pro-N value is greater than 0.212, the probability of receiving GBDR \geq 40% is low. Conversely, if the EGO-Pro-N value is less than or equal to 0.212, the probability is high. Sensitivity and specificity of the method were 71.9% and 70.0% respectively, accuracy was 70.9%. The developed model allows us to predict good and excellent quality embryos based on comprehensive semen microbiota assessment in normozoospermia before IVF.

Keywords: semen microbiota composition, prognosis, ART effectiveness, IVF, real-time PCR, discriminant analysis

Acknowledgments: the authors would like to thank VN Khayutin, director of "Garmonia" Medical Center, for allowing them to conduct the study in the clinic's laboratory department.

Author contribution: Panacheva EA — organization of the study, data analysis, conducting PCR tests, article authoring; Kudryavtseva EV, Zornikov DL — statistical processing, data analysis, article authoring; Plotko EE, Petrov VM — data analysis, article authoring; Voroshilina ES — organization of the study, conducting PCR tests, data analysis, article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol № 7 of September 20, 2019). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Voroshilina
Tveritina, 16, Yekaterinburg, 620100, Russia; voroshilina@gmail.com

Received: 23.03.2023 **Accepted:** 14.04.2023 **Published online:** 26.04.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.015

Необходимость в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) непрерывно растет, однако, по данным Национального регистра Российской Ассоциации репродукции человека (РАРЧ), эффективность программ ЭКО составляет не более 34,8% в расчете на перенос эмбрионов [1]. Одним из ключевых факторов наступления беременности при использовании ВРТ является получение достаточного количества эмбрионов хорошего и отличного качества [2]. Возможность прогнозировать количество получаемых эмбрионов хорошего качества позволит оптимизировать подготовку пациентов к проведению ВРТ и выбрать наиболее эффективный вариант ведения эмбриологического этапа. В настоящее время идет активный поиск маркеров качества эмбрионов на основании данных метаболомного, протеомного, транскриптомного статусов спермы, фолликулярной жидкости и эмбриологических сред, используемых для их культивирования [3]. При этом вопрос о влиянии микробиоты спермы на результаты ВРТ, в частности на качество получаемых эмбрионов, недостаточно изучен.

Процедура экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) происходит в нестерильных условиях [4]. Несмотря на тщательное соблюдение мер асептики, самое большее, чего удастся добиться, это снижение уровня микробного загрязнения в лабораториях ЭКО и в культуральных средах для эмбрионов. Используемые для получения эмбрионов гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки) поступают из источников, в большинстве случаев содержащих бактерии [5]. По данным молекулярно-генетических исследований, микробный состав эякулята может быть представлен сложными полимикробными сообществами, образованными представителями разных родов и даже филумов бактерий, включающих анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии, в том числе у пациентов без воспалительной патологии и с нормальными показателями спермограммы [6–8]. Установлена взаимосвязь между выявлением отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в эякуляте и снижением параметров спермограммы [9, 10].

В настоящее время в рамках подготовки мужчин к программам ВРТ требуется лишь исключить наличие в соскобе из уретры или эякуляте возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) [11]. Присутствие же других микроорганизмов, которые могут быть причиной как стертых форм воспалительного процесса урогенитального тракта (УГТ) мужчин, так и неудач в протоколах ВРТ, не оценивают.

С проблемой бактериальной контаминации сред во время культивирования эмбрионов сталкиваются практически все лаборатории ЭКО [12, 13]. По данным литературы, частота бактериальной контаминации не превышает 1%, однако это событие может привести к получению эмбрионов плохого качества, гибели всех эмбрионов и, соответственно, прекращению лечебного цикла ВРТ.

Одним из основных источников бактериальной контаминации сред для культивирования эмбрионов считают микробиоту эякулята [12]. Несмотря на тщательную обработку в полученной порции эякулята остаются микроорганизмы, которые могут привести к контаминации питательной среды для эмбрионов. В случае классического ЭКО совместное культивирование обработанного эякулята и яйцеклеток проводят в течение 16–20 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Такие условия благоприятны для развития микроорганизмов, в первую очередь для облигатных анаэробов. Как следствие, среды могут содержать токсичные бактериальные метаболиты. Результатом негативного

воздействия бактериальных токсинов может стать фрагментация и гибель клеток эмбриона [13].

Влияние микробиоты эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ, на развитие эмбрионов следует оценивать более тщательно, чтобы разработать адекватные меры по предотвращению неудачных исходов эмбриологического этапа ВРТ.

Целью настоящего исследования была разработка математической модели для прогнозирования качества получаемых эмбрионов на основании результатов оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ при нормозооспермии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Одноцентровое когортное ретроспективное исследование включало в себя оценку параметров спермограммы и микробного состава эякулята 127 мужчин, вступивших в программу ВРТ в Медицинском центре «Гармония» (г. Екатеринбург, Россия) с 2020 по 2021 г. Оценивали также параметры эмбриологического этапа ВРТ в данных программах: частоту оплодотворения, частоту образования blastocyst и частоту образования blastocyst отличного и хорошего качества, имеющих максимальный потенциал к имплантации.

Критерии включения и исключения

Критерии включения: возраст пациентов 19–51 год; отсутствие приема пациентами гормональных, антибактериальных препаратов в течение последних трех месяцев; соответствие параметров спермограммы нормозооспермии; оплодотворение яйцеклеток методом классического ЭКО; согласие на участие в исследовании; возраст женщин 22–40 лет; отсутствие генетических заболеваний у пациентов и их родственников. В исследование были включены программы со свежими ооцитами с использованием классического ЭКО. Критерии исключения: использование для оплодотворения размороженных ооцитов; оплодотворение яйцеклеток методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ); клинические проявления инфекционно-воспалительных заболеваний УГТ; наличие ИППП; наличие у пациентов или их родственников генетических заболеваний; объем эякулята менее 2 мл; отказ пациентов от участия в исследовании.

Эмбриологический этап ВРТ

Ооцит-кумулюсные комплексы помещали в среду Flushing (Origio; Дания). Для оплодотворения ооцитов использовали среду Sequential Fert (Origio; Дания). После оценки оплодотворения зиготы помещали в среду SAGE 1-Step (Origio; Дания), в которой эмбрионы культивировали до 5-го дня.

Для обработки образцов эякулята использовали метод осаждения в градиентах плотности SupraSperm (Origio; Дания), затем сперматозоиды дважды отмывали в буфере SpermPrep (Origio; Дания), после чего использовали метод «swim-up».

Оценка морфологии эмбрионов

Качество развивающихся зигот и эмбрионов индивидуально оценивали под микроскопом приблизительно через 18, 72

и 96 ч после оплодотворения. Морфологическую оценку эмбрионов проводили на 5-е сутки развития от момента оплодотворения.

Эмбрионы отличного и хорошего качества на 5-й день культивирования имели следующие морфологические характеристики: в составе внутриклеточной массы достаточно много плотно упакованных клеток, трофэктодерма содержит много клеток, сформировавших плотный эпителий, бластоцель занимает более 80% объема эмбриона. Приемлемым уровнем эффективности эмбриологического этапа ВРТ считали получение не менее 40% бластоцист хорошего и отличного качества (good-quality blastocyst development rate (GBDR) от общего количества оплодотворенных яйцеклеток: GBDR \geq 40% [14].

В зависимости от доли бластоцист хорошего и отличного качества, сформировавшихся на эмбриологическом этапе культивирования, пациенты были разделены на две группы: в первую включено 57 пациентов, у которых GBDR \geq 40%, во вторую — 70 пациентов (GBDR < 40%).

Методы исследования

Индукцию суперовуляции в обеих группах проводили по короткому протоколу с использованием антагонистов рекомбинантных и/или мочевых гонадотропинов в суточной дозе 150–300 МЕ. В качестве триггера овуляции применяли хорионический гонадотропин человека за 34–36 ч до пункции. Аспирацию фолликулов выполняли под внутривенным наркозом.

Подготовку мужчин и отбор образцов эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по сбору эякулята для микробиологических исследований (пункт 2.2.4 Руководства ВОЗ) [15]. Обязательным условием было половое воздержание участника в течение 3–4 дней. Сбор эякулята пациенты осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер после предварительного мочеиспускания и тщательного туалета наружных половых органов, с использованием мыла и стерильных салфеток.

Клиническим материалом для исследования служил нативный эякулят. Анализ концентрации и подвижности сперматозоидов проводили с использованием анализатора Биола АФС-500 («Биола»; Россия). Морфологию сперматозоидов оценивали в окрашенных препаратах при увеличении микроскопа 1000 \times с использованием иммерсионного объектива. Для подсчета пероксидазо-положительных лейкоцитов использовали тест LeucoScreen (FertiPro; Бельгия). Критериям нормозооспермии соответствовали пробы с объемом эякулята не менее 1,5 мл, концентрацией сперматозоидов не менее 15 млн/мл, общей подвижностью не менее 40% или прогрессивной подвижностью не менее 32%, нормальной морфологией сперматозоидов не менее 4%, количеством лейкоцитов не более 1 млн/мл, отсутствием повышенной вязкости. Определение микробного состава эякулята проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью тест-системы Андрофлор («ДНК-Технология»; Россия) в детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология»; Россия).

Материал для исследования (0,5 мл нативного эякулята) собирали в день оплодотворения яйцеклеток в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл раствора буфера (ПРОБА ПК; «ДНК-Технология»; Россия). ДНК выделяли с

использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС («ДНК-Технология»; Россия). ПЦР-РВ проводили согласно инструкции производителя.

После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения проводили автоматический расчет количества ОБМ и количества каждой группы УГМ в представленном образце. Положительные сигналы по изучаемым микроорганизмам фиксировали не позднее 35-го цикла амплификации, что эквивалентно микробной нагрузке менее 10³ геномэквивалент/мл (ГЭ/мл). Расчет доли отдельных видов и групп бактерий проводили относительно суммы всех выявленных в образце бактерий. Набор «Андрофлор» предназначен для определения ОБМ и 19 групп УГМ (*Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa / Ralstonia spp. / Burkholderia spp.*, *Enterobacteriaceae / Enterococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis (G. vaginalis)*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp. / Leptotrichia spp. / Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp.*, *Bacteroides spp. / Porphyromonas spp. / Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium cluster (A. cluster)*, *Mycoplasma hominis (M. hominis)*, *Ureaplasma urealyticum (U. urealyticum)*, *Ureaplasma parvum (U. parvum)*, *Candida spp.*), присутствия облигатных патогенов (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*) и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала).

Методы статистического анализа

Статистическую обработку данных проводили с помощью R-версии 4.2.2 (сборка 2022-10-31) и StatPlus:mac 8.0.3 (AnalystSoft; США). Нормальность распределения признаков проверяли тестом Шапиро–Уилка. В качестве средних величин при описании переменных указывали медиану с процентилями 0,05 и 0,95. Достоверность различий между сравниваемыми количественными показателями оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни, между частотными показателями — с помощью точного двустороннего теста Фишера. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для формирования уравнения регрессии, которое легло в основу прогностической модели получения не менее 40% эмбрионов хорошего и отличного качества, использовали метод дискриминантного анализа с расчетом канонических коэффициентов дискриминантной функции (ККДФ). Для оценки эффективности предлагаемой прогностической модели был применен ROC-анализ. Оптимальный порог определяли по значению индекса Юдена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-anamnestическая характеристика обследованных пациентов

Вначале было проведено сравнение групп по анамнестическим показателям. Группы не различались по возрасту мужчин (35,0 (28,8–43,2) против 34,0 (28,5–45,0) лет в группах 1 и 2 соответственно; $p = 0,664$) и возрасту женщин (34,0 (26,0–40,0) против 34,0 (28,0–40,0) лет в группах 1 и 2 соответственно; $p = 0,507$). По массо-ростовым показателям различия были не существенными ($p > 0,05$). Учитывали данные соматического

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп микроорганизмов в надпороговых значениях*

Группы микроорганизмов	Частота выявления				Значимость p
	Группа 1 (n = 57)		Группа 2 (n = 70)		
	n	%	n	%	
<i>Lactobacillus spp.</i>	17	29,8	11	15,7	0,084
Грамположительные факультативные анаэробы	24	42,1	23	32,9	0,356
<i>Staphylococcus spp.</i>	6	10,5	3	4,3	0,297
<i>Streptococcus spp.</i>	7	12,3	13	18,6	0,463
<i>Corynebacterium spp.</i>	21	36,8	16	22,9	0,116
Грамотрицательные факультативные анаэробы	0	0	11	15,7	0,001
<i>Haemophilus spp.</i>	0	0	10	14,3	0,002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia spp.</i> / <i>Burkholderia spp.</i>	0	0	1	1,4	1
Облигатные анаэробы	35	61,4	41	58,6	0,856
<i>G.vaginalis</i>	8	14	17	24,3	0,181
<i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i>	10	17,5	18	25,7	0,291
<i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i>	4	7	5	7,1	1
<i>Bacteroides spp.</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> / <i>Prevotella spp.</i>	14	24,6	24	34,3	0,25
<i>Peptostreptococcus spp.</i> / <i>Parvimonas spp.</i>	8	14	11	15,7	1
<i>Anaerococcus spp.</i>	17	29,8	14	20	0,219
<i>Eubacterium spp.</i>	30	52,6	29	41,4	0,217
<i>A.cluster</i>	4	7	7	10	0,753
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	8	14	6	8,6	0,398
Микоплазмы	10	17,5	11	15,7	0,814
<i>U. urealyticum</i>	2	3,5	4	5,7	0,69
<i>U. parvum</i>	7	12,3	7	10	0,779
<i>M. hominis</i>	2	3,5	2	2,9	1

Примечание: * — для групп *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* надпороговые значения > 0 , для остальных групп микроорганизмов $\geq 10^3$ ГЭ/мл.

анамнеза. Частота выявления соматической патологии (заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыводящей, дыхательной и нервной систем, эндокринопатий, патологии желудочно-кишечного тракта и аутоиммунных заболеваний) тоже не различалась между группами ($p > 0,05$). Таким образом, группы оказались клинически сопоставимыми.

Данные эмбриологического этапа

Количество зрелых ооцитов MII составило 559 и 606 в группе 1 и группе 2 соответственно. При этом среднее количество ооцитов, полученных при пункции, у пациенток групп 1 и 2 не различалось (медианы составили 9 и 8, $p = 0,250$). В результате оплодотворения методом ЭКО получено 458 зигот в группе 1 и 442 в группе 2, среднее количество полученных зигот не различалось между группами (медианы составили 6 и 5,5 для групп 1 и 2, соответственно; $p = 0,207$). Для каждой пары рассчитывали долю оплодотворенных яйцеклеток, уровень бластуляции и показатель GBDR. По доле оплодотворенных яйцеклеток пациентки группы 1 и группы 2 не различались (медианы составили 85,7% и 80,0% соответственно; $p = 0,471$), тогда как по уровню бластуляции и показателю GBDR были выявлены достоверные различия. Уровень бластуляции

составил 75,0% в группе 1 и 37,5% в группе 2 ($p < 0,001$); показатель GBDR — 72,7% в группе 1 и 27,7% в группе 2 ($p < 0,001$).

Анализ микробного состава эякулята

Бактериальная ДНК (ОБМ) отсутствовала или определялась в количестве менее 10^3 ГЭ/мл в 5 (8,8%) из 57 образцов группы 1 и 5 (7,1%) из 70 образцов группы 2 ($p = 0,752$). В положительных образцах одновременно выявляли от 1 до 13 групп микроорганизмов в надпороговых значениях. Частота встречаемости отдельных групп бактерий в надпороговых значениях представлена в табл. 1.

В группе 1 значительно реже выявляли *Haemophilus spp.* и, как следствие, группу грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА), к которой относятся данные бактерии. Частота выявления других групп УПМ достоверно не различалась между группами 1 и 2. Учитывая статистически значимые различия по частоте выявления *Haemophilus spp.* и ГОФА между группами 1 и 2, мы попытались оценить отличия по количеству данных групп микроорганизмов и их прогностическую эффективность в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ, однако получили неудовлетворительные результаты (табл. 2).

Таблица 2. Средние количества *Haemophilus spp.* и ГОФА в группах 1 и 2 и прогностическая эффективность данных показателей в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ

Группа микроорганизмов	Среднее количество, медиана, процентиля 0,05 и 0,95		p	Значение AUC (95%-й ДИ)
	Группа 1	Группа 2		
<i>Haemophilus spp.</i> , ГЭ/мл	0 (0-0)	0 (0-103,8)	0,003	0,571 (0,472-0,671)
ГОФА, ГЭ/мл	0 (0-0)	0 (0-103,8)	0,002	0,579 (0,479-0,678)

Ни один из отдельных параметров микробиоты эякулята не демонстрировал приемлемой прогностической эффективности в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ. В связи с многообразием сочетаний, в которых встречались отдельные группы УПМ, было решено применить для этих целей дискриминантный анализ с расчетом прогностического индекса, учитывающего все значимые параметры микробиоты эякулята.

Дискриминантный анализ

Для прогнозирования GBDR $\geq 40\%$ для пар, в которых параметры спермограммы у мужчины соответствовали критериям нормозоосперии, нами был разработан прогностический индекс ЭХО-Про-N («Эмбрионы хорошего и отличного качества. Прогноз нормозооспермия»).

Для разработки прогностического индекса в полученных матрицах клинико-лабораторных показателей провели дискриминантный анализ переменных в исследуемых группах.

Для определения вклада каждого отдельного микроорганизма в формирование вероятности получения GBDR $\geq 40\%$ и разработки прогностического индекса проведено ранжирование признаков с помощью расчета ККДФ.

Индекс ЭХО-Про-N рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭХО-Про-N} = 0,22 - X1 - 0,26 - X2 - 0,59 - X3 + 0,25 - X4 + 0,26 - X5 + 0,21 - X6 - 0,4 - X7 + 0,15 - X8 + 0,09 - X9 + 0,15 - X10 - 0,25 - X11 - 0,33 - X12 - 0,17 - X13 + 0,51 - X14 + 0,9 - X15 - 0,28 - X16 - 0,47, \text{ где}$$

X1 — общая бактериальная масса (ОБМ),

X2 — *Lactobacillus spp.*,

X3 — *Staphylococcus spp.*,

X4 — *G. vaginalis*,

X5 — *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*,

X6 — *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*,

X7 — *U. urealyticum*,

X8 — *U. parvum*,

X9 — *A. cluster*,

X10 — *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*,

X11 — *Anaerococcus spp.*,

X12 — *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.*,

X13 — *Eubacterium spp.*,

X14 — *Haemophilus spp.*,

X15 — *P. aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.*,

X16 — *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.*

Если значение ЭХО-Про-N $> 0,212$, можно прогнозировать, что вероятность GBDR $\geq 40\%$ низкая, если ЭХО-Про-N $\leq 0,212$ — высокая.

Среднее значение ЭХО-Про-N в группах 1 и 2 составило соответственно $-0,470$ ($-2,430$; $-0,580$) и $0,365$ ($-0,933$; $-2,260$). Различия статистически значимы ($p < 0,001$). Графически значение индекса ЭХО-Про-N представлено на рис. 1.

ROC-кривая для индекса ЭХО-Про-N представлена на рис. 2. Площадь под кривой (area under the curve, AUC)

составляет $0,777$ (95%-й ДИ: $0,670-0,856$), что соответствует хорошему качеству модели прогнозирования.

Оптимальное значение порога для индекса ЭХО-Про-N составило $0,212$. Данный порог позволял прогнозировать получение GBDR $\geq 40\%$ с чувствительностью $71,9\%$ и специфичностью $70,0\%$ при общей эффективности метода $70,9\%$ (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее исследование были включены пары, участвовавшие в протоколах ВРТ, параметры спермограммы у которых соответствовали критериям нормозооспермии. Согласно действующим клиническим рекомендациям, наличие возбудителей ИППП было исключено у обоих супругов на этапе предгравидарной подготовки [11]. Такие образцы эякулята рассматривают как идеально подходящие для проведения ЭКО, и в рутинной клинической практике расширенное исследование микробного состава эякулята не проводят. Наше исследование показало, что большинство использованных образцов эякулята содержали бактериальную ДНК в количестве не менее 10^3 ГЭ/мл. В положительных образцах одновременно идентифицировали до 13 групп микроорганизмов в различных сочетаниях. Наличие бактерий в эякуляте было показано ранее в многочисленных исследованиях, наши наблюдения в очередной раз подтверждают этот факт [4, 6, 8, 10, 16].

Нас интересовал микробный состав эякулята с точки зрения его потенциально негативного влияния на исход эмбриологического этапа ВРТ. В ходе исследования мы установили, что микробный состав образцов эякулята, с использованием которых доля blastocyst хорошего качества на 5-е сутки была приемлемой (GBDR $\geq 40\%$), отличался от состава тех образцов, использование которых не позволяло получить достаточное количество эмбрионов. Для последней группы было характерно присутствие грамотрицательных факультативных анаэробов (преимущественно *Haemophilus spp.*). В то же время в образцах эякулята, с использованием которых эффективность эмбриологического этапа была удовлетворительной, отмечена тенденция к более частому обнаружению *Lactobacillus spp.* и *Corynebacterium spp.*, но без статистической значимости. Именно это наблюдение привело нас к попытке смоделировать прогностическую модель на основе показателей микробиоты эякулята, которую можно было бы использовать для оценки его качества еще на этапе предгравидарной подготовки.

Попытки предсказать эффективность эмбриологического этапа ВРТ проводились неоднократно с использованием данных протеомного, транскриптомного и метаболомного анализа спермы, фолликулярной жидкости и культуральных сред [2, 3]. По некоторым данным, 93 вида белков спермы могут быть функционально связаны с формированием зиготы и следующими стадиями развития эмбриона на эмбриологическом этапе ВРТ [17]. Выявлены потенциальные белковые маркеры в сперме, которые могли

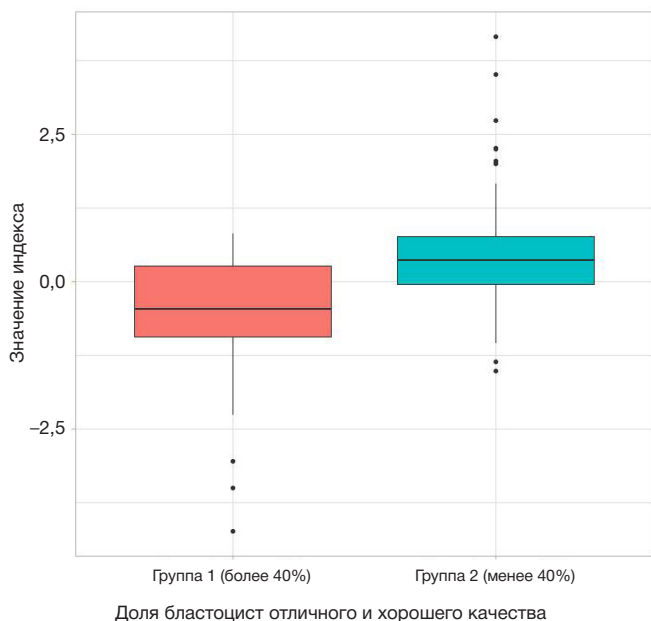


Рис. 1. Значения индекса ЭХО-Про-N в группах 1 и 2

бы предсказать исход ВРТ *in vitro* у пар с идиопатическим бесплодием [16]. Присутствие *Alphaproteobacteria* в сперме у пациентов с нормозооспермией снижало вероятность получения эмбрионов отличного и хорошего качества [4]. Однако данные наблюдения не привели к созданию реально работающих прогностических моделей.

Разработанная нами математическая модель с расчетом прогностического индекса ЭХО-Про-N может быть использована на этапе предгравидарной подготовки пар к процедуре ВРТ, особенно в тех случаях, когда ожидаемое число яйцеклеток будет невелико, и каждый эмбрион хорошего и отличного качества бесценен.

Важно уточнить, что бактериальная контаминация культуральных сред с эмбрионами была зарегистрирована только в случаях оплодотворения яйцеклеток методом классического ЭКО. В программах с использованием ИКСИ, когда с помощью микроинструментов в яйцеклетку вводится один сперматозоид, такие случаи не зарегистрированы [18]. Вероятно, это связано с тем, что в

Таблица 3. Чувствительность и специфичность индекса ЭХО-Про-N (классификационная матрица)

Группа/ Прогноз	1	2	Всего	Количество правильных, %
1	41	16	57	71,9
2	21	49	70	70
Всего	62	65	127	70,9

Литература

- Корсаков В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация репродукции человека». Отчет за 2020 год. Проблемы репродукции. 2022; 28 (6): 12–27.
- Ильина А. А., Калинина И. И., Трошина Т. Г., Ильин К. А., Болтовская М. Н., Степанова И. И., и др. Фолликулярная жидкость как среда, определяющая качество ооцита и исход программ ВРТ (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2008; 14 (4): 27–39.
- Валиахметова Э. З., Кулакова Е. В., Скибина Ю. С., Грязнов А. Ю., Сысоева А. П., Макарова Н. П. и др. Неинвазивное тестирование преимплантационных эмбрионов человека *in vitro* как способ прогнозирования исходов программ экстракорпорального оплодотворения. Акушерство и гинекология. 2021; 5: 5–16.
- Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure. Reproductive Biology and Endocrinology. 2020; 18: 1–13.
- Franasiak JM, Scott Jr RT. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. Fertility and sterility. 2015; 104 (6): 1364–71.

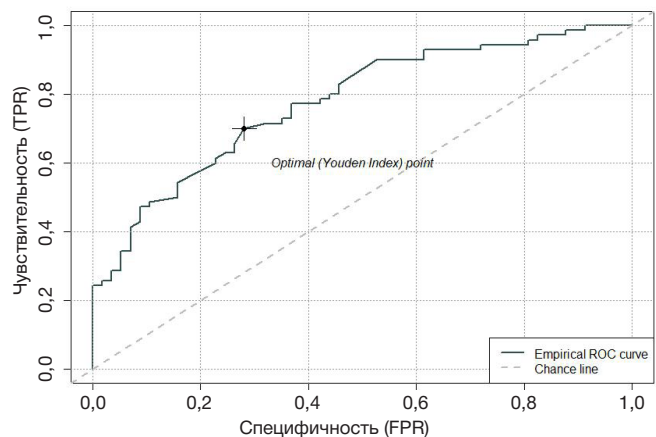


Рис. 2. ROC-кривая для индекса ЭХО-Про-N

случае ИКСИ в культуральную среду привносится меньшее количество жизнеспособных бактерий. Таким образом, с целью увеличения эффективности программы ЭКО в случае получения негативного прогноза на получение достаточного количества эмбрионов хорошего качества может быть рекомендовано проведение ИКСИ.

Выводы

Разработанная нами прогностическая модель дает возможность прогнозирования качества получения эмбрионов на основании комплексной оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения методом ЭКО. Оценка микробного состава эякулята у мужчин, планирующих проведение ВРТ, возможна еще на этапе предгравидарной подготовки, в том числе в тех случаях, когда параметры спермограммы соответствуют критериям нормозооспермии. Использование предлагаемого прогностического индекса ЭХО-Про-N обосновывает разработку индивидуального плана лечения для пациентов ВРТ, нацеленного на получение оптимального количества высококачественных эмбрионов. Предлагаемый метод прогноза можно широко использовать в клинической практике, он не требует значительных материальных затрат и организационных усилий.

6. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Иванов А. В., Почерников Д. Г., Паначева Е. А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2020; (5): 66–73.
7. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring, Wang SL, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and sterility*. 2013; 100 (5): 1261–9.
8. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS one*. 2014; 9 (10): e110152.
9. Pagliuca C, Cariati F, Bagnulo F, Scaglione E, Carotenuto C, Farina F et al. Microbiological evaluation and sperm DNA fragmentation in semen samples of patients undergoing fertility investigation. *Genes*. 2021; 12 (5): 654.
10. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 234.
11. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 31 июля 2020 г. N 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».
12. Lin LL, Guu HF, Yi YC, Kung HF, Chang JC, Chen YF, et al. Contamination of ART culture Media—The role of semen and strategies for prevention. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2021; 60 (3): 523–5.
13. Li R, Du F, Ou S, Ouyang N, Wang W. A new method to rescue embryos contaminated by bacteria. *F&S Reports*. 2022; 3 (2): 168–71.
14. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017; 35 (5): 494–510.
15. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, пятое издание. Москва, 2012.
16. Jodar M, Attardo-Parrinello C, Soler-Ventura A et al. Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2020; 40 (5): 700–10.
17. Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 2018; 24 (5): 535–55.
18. Peter MM Kastrop, Lia AM de Graaf-Miltenburg, Dagmar R Gutknecht, Sjerp M Weima. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Human Reproduction*. 2007; 22 (8): 2243–48.

References

1. Korsak VS, Smirnova AA, Shurygina OV. Registr VRT Obshherossijskoj obshhestvennoj organizacii «Rossijskaya associaciya reprodukcii cheloveka». Otchet za 2020 god. *Problemy reprodukcii*. 2022; 28 (6): 12–27. Russian.
2. Ilna AA, Kalinina II, Troshina TG, Ilin KA, Boltovskaya MN, Stepanova II, i dr. Follikulyarnaya zhidkost' kak sreda, opredelyayushhaya kachestvo oocita i ishod programm VRT (obzor literatury). *Problemy reprodukcii*. 2008; 14 (4): 27–39. Russian.
3. Valiaxmetova EhZ, Kulakova EV, Skibina YuS, Gryaznov AYU, Syssoeva AP, Makarova NP, i dr. Neinvazivnoe testirovanie preimplantacionnyx ehmbriionov cheloveka in vitro kak sposob prognozirovaniya ishodov programm. *Russian. ehkstrakorporal'nogo oplodotvoreniya. Akusherstvo i ginekologiya*. 2021; 5: 5–16.
4. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Pam Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18: 1–13.
5. Frasiak JM, Scott Jr RT. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*. 2015; 104 (6): 1364–71.
6. Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernnikov DG, Panacheva EA. Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data. *Bulletin of RSMU*. 2020; (5): 62–9. DOI: 10.24075/brsmu.2020.064.
7. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring, Wang SL, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and sterility*. 2013; 100 (5): 1261–9.
8. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS one*. 2014; 9 (10): e110152.
9. Pagliuca C, Cariati F, Bagnulo F, Scaglione E, Carotenuto C, Farina F et al. Microbiological evaluation and sperm DNA fragmentation in semen samples of patients undergoing fertility investigation. *Genes*. 2021; 12 (5): 654.
10. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 234.
11. Prikaz Ministerstva zdravooxraneniya RF ot 31 iyulya 2020 g. N 803n «O poryadke ispol'zovaniya vspomogatel'nyx reproductivnyx tehnologij, protivopokazaniyax i ogranicheniyax k ix primeneniyu». Russian.
12. Lin LL, Guu HF, Yi YC, Kung HF, Chang JC, Chen YF, et al. Contamination of ART culture Media—The role of semen and strategies for prevention. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2021; 60 (3): 523–5.
13. Li R, Du F, Ou S, Ouyang N, Wang W. A new method to rescue embryos contaminated by bacteria. *F&S Reports*. 2022; 3 (2): 168–71.
14. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017; 35 (5): 494–510.
15. WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed.; WHO Press, World Health Organization: Geneva, Switzerland. 2010.
16. Jodar M, Attardo-Parrinello C, Soler-Ventura A et al. Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2020; 40 (5): 700–10.
17. Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 2018; 24 (5): 535–55.
18. Peter MM Kastrop, Lia AM de Graaf-Miltenburg, Dagmar R Gutknecht, Sjerp M Weima. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Human Reproduction*. 2007; 22 (8): 2243–48.