

*На правах рукописи*

**ЧУНЧАЕВА**

Луиза Казбековна

**КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСОБЕННОСТИ ПРОГРАММ ПЕРЕНОСА  
ЭУПЛОИДНОГО ЭМБРИОНА У ПАЦИЕНТОК С  
НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ  
I и II СТАДИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель:**

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

**Официальные оппоненты:**

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

**Панина Ольга Борисовна** - доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится «19» сентября 2023 г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

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

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Chunchaeva%20LK-disser.pdf?1057772135>

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

Ученый секретарь  
диссертационного совета, доктор  
медицинских наук, профессор



Е.А. Калинина

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Преодоление бесплодия у больных с наружным генитальным эндометриозом является одной из наиболее актуальных проблем акушерства и гинекологии. Это обусловлено высокой частотой заболевания, многофакторной природой нарушения репродуктивной функции при данной патологии, поздним и часто неэффективным использованием методов ВРТ

Несмотря на множество исследований, посвященных влиянию НГЭ на исходы программ ВРТ, последствия влияния патологии на качество эмбрионов остаются неясными.

С развитием молекулярных методов исследования в клинической практике стало появляться все больше методов, позволяющих изучить патогенез наружного генитального эндометриоза у женщин с бесплодием в программах ВРТ.

Изучение метаболома (комплекса промежуточных и конечных продуктов обмена веществ, гормонов, сигнальных молекул и вторичных метаболитов) у пациенток с наружным генитальным эндометриозом позволит понять биологические процессы, лежащие в основе неудач имплантации эуплоидных эмбрионов.

### **Степень разработанности темы исследования**

Диссертационная работа представляет собой оригинальное завершённое научное исследование, проведенное на высоком методическом уровне с использованием новых молекулярных методов. Достоверность полученных результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач работы и их решением.

В диссертации проведено корректное сравнение полученных результатов с данными современной литературы.

### **Цель исследования**

Оценить влияние наружного генитального эндометриоза I и II стадии распространения у женщин на клинические и эмбриологические показатели

в программах лечения бесплодия методами ВРТ при переносе эуплоидного эмбриона в полость матки и обосновать полученные результаты методами метаболомного профилирования.

### **Задачи исследования**

Оценить клинико-анамнестические данные пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.

Провести сравнительную характеристику эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения и женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Выявить особенности проведения овариальной стимуляции и подготовки эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.

Проанализировать метаболомный профиль фолликулярной жидкости женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения.

Провести сравнительный анализ метаболомного профилю обработанных культуральных сред от эуплоидных эмбрионов, полученных от пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения и женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Уточнить патогенетический механизм нарушений репродуктивной функции у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения на основании полученных данных метаболомного профилирования.

### **Научная новизна**

Перспективное исследование, проведенное у супружеских пар в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А, где у супруги был

подтвержденный диагноз наружный генитальный эндометриоз I и II стадии распространения, показало ухудшение таких эмбриологических показателей, как частота оплодотворения и частота бластуляции. Данные нарушения у женщин вызваны повышением частоты встречаемости дисморфизмов ооцитов.

На 5 сутки культивирования у пациенток с НГЭ I и II стадии распространения выявлено снижение скорости формирования эмбрионов в сравнении с женщинами в группе с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. Сравнительный анализ метаболомного профиля фолликулярной жидкости позволил уточнить патогенетические звенья снижения скорости формирования бластоцист при наружном генитальном эндометриозе.

Впервые показано, что у женщин с НГЭ I и II стадии распространения в фолликулярной жидкости достоверно повышена концентрация окисленных липидов, что негативно влияет на качество женских половых клеток и приводит к снижению эффективности лечения бесплодия методами ВРТ, в том числе и с ПГТ-А.

Изученные метаболомные профили отработанных культуральных сред от эуплоидных эмбрионов впервые показали разницу в составе метаболитов у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в сравнении с женщинами в группе с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Полученные омиксные данные позволили расширить понимание патологических процессов, лежащих в основе нарушений репродуктивной функции у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.

### **Практическая значимость**

Полученные данные о влиянии протоколов овариальной стимуляции и подготовки эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения позволяют оптимизировать тактику ведения супружеских пар. Снижение числа получаемых при трансвагинальной

пункции ооцит-кумулюсных комплексов у таких пациенток диктует необходимость повышения дозы гонадотропинов с целью получения большего количества ооцитов и улучшения исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ.

На основании сравнительного анализа частоты эуплоидий установлено, что женщины с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения репродуктивного возраста не нуждаются в проведении ПГТ-Поскольку вероятность рождения детей с хромосомными аномалиями у таких супружеских пар сравним с пациентками в группе с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Изученные в диссертационной работе клинические, эмбриологические и метаболомные данные о влиянии наружного генитального эндометриоза I и II стадии распространения на эффективность лечения позволяют оптимизировать тактику планирования беременности с учетом диагноза в программах ВРТ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Показатели овариального резерва (уровни АМГ, ФСГ, количество антральных фолликулов) пациенток с наружным генитальным эндометриозом I–II стадии распространения не различаются с группой женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

2. Наружный генитальный эндометриоз I - II стадии распространения оказывает негативное влияние на эмбриологические показатели программ лечения бесплодия методами ВРТ: 1) частота оплодотворения достоверно снижается с 90% при трубно-перитонеальном факторе бесплодия до 77,5% при НГЭ ( $p < 0,05$ ); 2) происходит задержка эмбриогенеза, что выражается в формировании бластоцист к 6 суткам в 2,4 раза чаще, чем на 5 сутки. Возможной причиной служат нарушения оогенеза: шанс появления ооцитов с морфологическими дисморфизмами в 1,3 раза выше у женщин с НГЭ по сравнению с ТПФ

3. Протокол овариальной стимуляции не оказывает влияния на

плоидность эмбрионов у пациенток раннего репродуктивного возраста с наружным генитальным эндометриозом I–II стадии распространения и составляет 49,1%, что сопоставимо с группой сравнения - 50,0%.

4. Метаболический профиль фолликулярной жидкости и сред культивирования эмбрионов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения существенно отличается от такового при трубно-перитонеальном факторе бесплодия. Достоверное повышение содержания окисленных липидов в фолликулярной жидкости пациенток с НГЭ позволяет объяснить повышенную частоту появления ооцитов с дисморфизмами и снижение эмбриологических и клинических показателей программы ВРТ.

#### **Личный вклад автора**

Автор принимал участие в выборе темы диссертационного исследования, постановке цели и задач, разработке дизайна и систематизации данных современной научной литературы по теме работы. Непосредственно участвовал в лечении супружеских пар на всех этапах в циклах ВРТ, сборе биологического материала, участвовал в выполнении лабораторной части исследования, анализе, обобщении и статистической обработке полученных данных.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта специальности «Акушерство и гинекология».

#### **Апробация работы**

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б. В. Леонова Института репродуктивной медицины 24 июня 2021 года и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»

Минздрава России (17.04.2023 г., протокол №5).

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

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель – д.м.н., профессор Калинина Е.А.).

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из которых 3 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, 1 статья опубликована в иностранном журнале International Journal of Molecular Sciences с Impact Factor 6,208 (SCORPUS).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена в традиционной форме на 138 страницах печатного текста. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 20 таблицами и 12 рисунками. Библиографический указатель включает 145 литературных источников, из них 16 — русскоязычных и 129 — иностранных.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

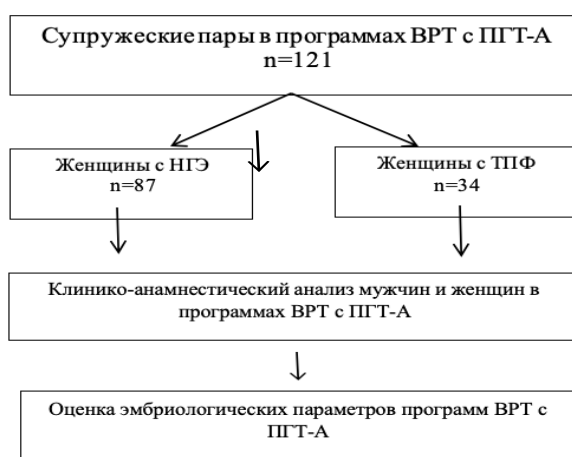
В работу вошла 121 супружеская пара с женщинами репродуктивного возраста с сохраненным овариальным резервом и с диагнозом НГЭ I и II стадии распространения, подтвержденным в ходе оперативного вмешательства не позднее 2-х лет до момента вступления в программу ВРТ, обратившихся по поводу лечения бесплодия в отделение вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.).

Перед началом программы от каждой супружеской пары было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в



исследовании. Все пациенты прошли полное обследование перед проведением программы ВРТ, которое включало сбор анамнестических данных, клинко-лабораторные и функциональные методы исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021).

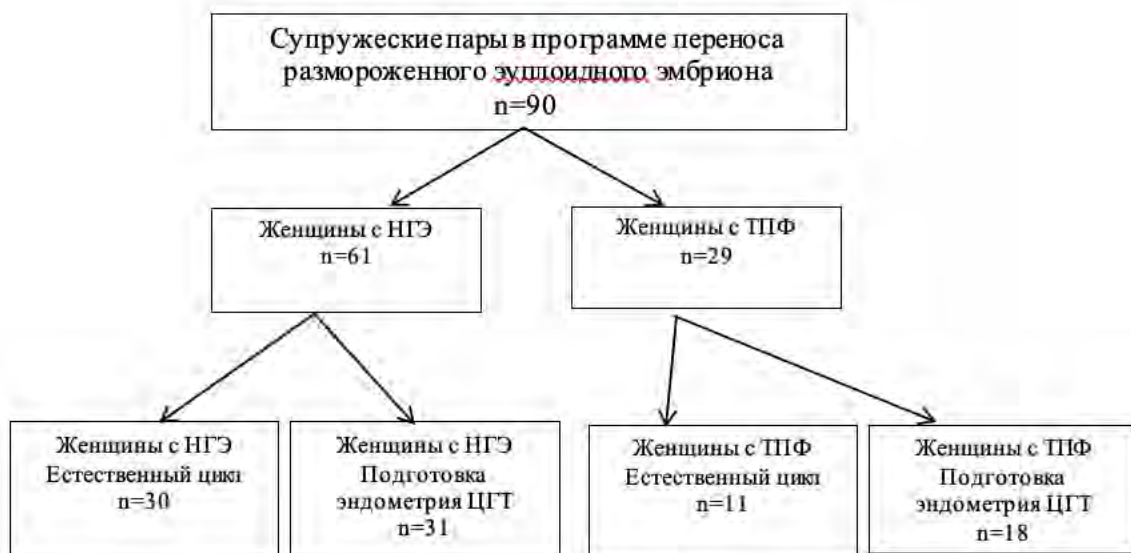
Для решения поставленных задач все супружеские пары были разделены на 2 группы: 87 супружеских пар, проходивших лечение в программе ВРТ с ПГТ-А и селективным переносом эмбриона в криоцикле, где женщина страдала НГЭ I или II стадией распространения, II группа (группа сравнения, ТПФ): 34 супружеские пары с ТПФ, проходивших лечение в программе ЭКО с ПГТ-А и селективным переносом эмбриона в криоцикле. Дизайны исследований в соответствии с поставленными задачами представлены на рисунках 1-4.



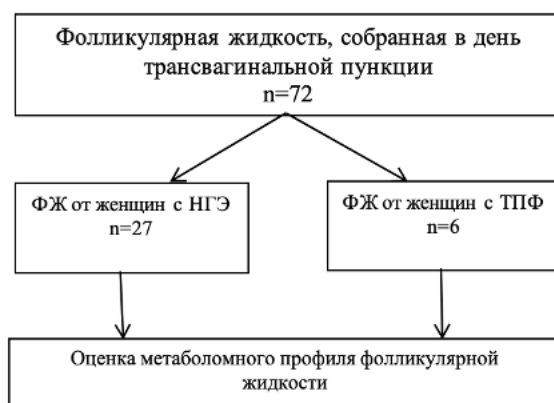
**Рис.1** Дизайн исследования для оценки клинко-анамнестических и эмбриологических параметров в программах ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ и ТПФ



**Рис.2.** Дизайн исследования для оценки влияния протокола овариальной стимуляции на параметры раннего эмбриогенеза и исходы программ ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ



**Рис.3.** Дизайн исследования для оценки влияния протокола подготовки эндометрия на исходы программ ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ и ТПФ.



**Рис.4.** Дизайн исследования для оценки метаболомного профиля фолликулярной жидкости пациенток с НГЭ и ТПФ



**Рис.5.** Дизайн исследования для оценки метаболомного профиля отработанных культуральных сред в программах ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ и ТПФ

Первый этап работы представил из себя анализ клинико-лабораторных данных пациентов, которые влияют на результативность программ ВРТ. На втором этапе проводили оценку и сравнение эмбриологических и клинических параметров в группах сравнения. На третьем этапе исследования были изучены метаболомные профили фолликулярной жидкости и сред культивирования у женщин выделенных групп.

Для овариальной стимуляции функции яичников был выбран протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ). Дополнительно в ходе нашей работы для выявления особенностей проведения овариальной стимуляции и подготовки эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А было проведено ретроспективное исследование «случай-контроль».

При проведении овариальной стимуляции женщины с НГЭ были

разделены на 2 группы: стимуляция в коротком протоколе с а-ГнРГ и в протоколе в ант-ГнРГ с последующей оценкой эмбриологических параметров и исходов программ ВРТ с ПГТ-А

А также на этапе переноса эуплоидного эмбриона в рамках программ криопереноса была произведена оценка влияния протокола подготовки эндометрия на исход программы ВРТ. 90 супружеских пар (61 в группе НГЭ и 29 пар в группе контроля) были разделены внутри групп на подгруппы переноса эмбриона в естественном цикле и на фоне ЦГТ.

Из специальных методов обследования в работе использованы:

- Оценка качества ооцитов и эмбрионов при помощи световой микроскопии (Nikon TE 300, общее увеличение x400).
- Биопсия бластоцист и преимплантационное генетическое тестирование на анеуплодии.
- Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) для детекции метаболитов в фолликулярной жидкости и отработанных средах культивирования.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и статистической программы SPSS Statistics 22 (США). Метод статистической обработки был использован в зависимости от типа данных. Делали вывод о достоверной значимости выявленных связей между фактором и исходом при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

На первом этапе был проведен анализ клинико-anamnestических и возрастных характеристик супружеских пар, включенных в исследование, где нами не было выявлено достоверных различий в сравниваемых нами группах.

При сравнении параметров гормонального профиля обращают на себя внимание уровни ТТГ и Т4, которые были статистически значимо выше в группе с НГЭ относительно контрольной группы с ТПФ, однако не превышали референсных значений. Функция щитовидной железы не

страдала или была скорректирована до начала программы ВРТ. Данные представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Гормональный профиль пациенток, включенных в исследование**

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	Норма	p
ТТГ, мМЕ/л	2,2 (1,5-2,9)	1,7 (1,4-2,3)	1,0–3,0 мМЕ/л	0,45
Т4 <sub>св</sub> , пмоль/л	13,7 (11,3-16,0)	13,2 (11,5-14,8)	10,0–25,0 пмоль/л	0,45

*Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни*

Анализ циклов стимуляции выявил, что всем пациенткам были назначены гонадотропины со средней продолжительностью стимуляции в 9 дней, средняя суммарная доза в группах достоверно не отличалась и составила 1800МЕ в группе НГЭ и 1500 — при ТПФ. Схема стимуляции функции яичников в программах ВРТ представлена в таблице 2.

**Таблица 2. Анализ циклов стимуляции функции яичников у пациенток, включенных в исследование**

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	p
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ	1800,0 (1425,0–2137,5)	1500,0 (1281,2–1950,0)	0,314
Продолжительность стимуляции, дни	9 (8,0–10,0)	9 (8,0–17,0)	0,659
Протокол с антГнРГ	74 (85,06%)	33 (97,06%)	0,109
Протокол с аГнРГ	13 (14,94%)	1 (2,94%)	0,109
Препараты ФСГ	36 (41,38%)	20 (58,82%)	0,105
Препараты ФСГ+ЛГ	51 (58,62%)	14 (41,18%)	0,105

*Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни \*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток*

При анализе параметров раннего эмбриогенеза (таблица 3), выявлено

что число полученных ооцит- кумулюсных комплексов (ОКК) было достоверно выше в группе ТПФ относительно НГЭ ( $p=0,046$ ).

**Таблица 3. Параметры фолликуло- и раннего эмбриогенеза в программе ВРТ с ПГТ-А у пациенток, включенных в исследование**

<b>Показатель</b>	<b>Группа I (НГЭ) n=87</b>	<b>Группа II (ТПФ) n=34</b>	<b>p</b>
<i>Число ОКК</i>	10,0 (7,0–15,0)	12,0 (8,0–17,0)	0,046
Частота зрелости ооцитов, %	77,78 (70,24; 96,25)	82,35 (71,4; 100)	0,381
Количество зигот	6,0 (5,0-10,0)	7,0 (5,3-11,0)	0,066
Частота оплодотворения, %	77,5 (69,0, 100)	90,0 (77,56, 100)	0,031
Количество бластоцист хорошего и отличного качества на 5 и 6 сутки культивирования	2,0 (1,0–4,0)	3,0 (1,0–4,0)	0,112

Доля получаемых зрелых ооцитов на стадии МII и пригодных для дальнейшего оплодотворения не отличалась между группами. Было зафиксировано статистически значимое различие в частоте оплодотворения между исследуемыми группами и для выяснения причин был проведен анализ морфологических изменений женских половых клеток. Все найденные дисморфизмы ооцитов были поделены на две группы: цитоплазматические (нарушение цитоплазмы в виде включений, зоны некроза, снижения тургора) и экстрацитоплазматические (утолщение блестящей оболочки, дебрис в перивителлиновом пространстве, нарушение первого полярного тельца). Результаты анализа представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Морфологические особенности ооцитов, полученных в программе лечения бесплодия методами ВРТ у женщин группы НГЭ и группы сравнения**

<b>Вид дисморфизма ооцита</b>	<b>Группа I (НГЭ) n=957</b>	<b>Группа II (ТПФ) n=628</b>	<b>ОШ, 95% ДИ</b>
Нормальные ооциты	41,6% (399/957)	58,7% (369/628)	1,398 [1,62; 2,44]
<i>Дисморфизмы ооцитов</i>			
Цитоплазматические аномалии	71,8% (401/558)	40,5% (105/259)	-
Экстрацитоплазматические аномалии	28,2% (157/558)	59,5% (154/259)	-

Согласно полученным результатам, снижение частоты оплодотворения в группе женщин с НГЭ может быть обусловлено большей частотой встречаемости дисморфизмов ооцитов. Нормальные ооциты в группе НГЭ составили 41,6%, в группе ТПФ — 58,7%. Рассчитанное отношение шансов составило 1,398 (ДИ 1,62; 2,44) и указывает, что при наличии НГЭ в 1,3 раза увеличена вероятность появления нарушений морфологии женских репродуктивных клеток, что может приводить к снижению частоты оплодотворения в данной когорте пациенток.

Далее было проведено сравнение морфологических характеристик эмбрионов в исследуемых группах на 5 и 6 сутки культивирования (общее количество бластоцист). По частоте встречаемости в группах было выявлено, что в группе с НГЭ чаще развивались эмбрионы «хорошего» качества на 5 сутки культивирования, по сравнению с ТПФ ( $p=0,04$ ), а также в группе с НГЭ на 6 сутки культивирования чаще развивались эмбрионы «удовлетворительного» качества ( $p=0,001$ ). Данные представлены в таблице 5.

Подобное «замедление» развития эмбрионов в группе НГЭ может быть обусловлено полученными на предыдущем этапе работы данными о частом появлении цитоплазматических аномалий ооцитов у женщин с НГЭ. Данные представлены в таблице 4.

**Таблица 5. Сравнение морфологических характеристик эмбрионов на 5-6 сутки развития в изучаемых группах**

	<b>Группа I (НГЭ) (n=171 эмбрион)</b>	<b>Группа II (ТПФ) (n=62 эмбриона)</b>	<b>p</b>
Эмбрионы отличного качества 5 сут	40 (23,4%)	11 (17,8%)	>0,05
Эмбрионы хорошего качества 5 сут	46 (26,9%)	25 (40,3%)	<0,05
Эмбрионы удовлетворительно го качества 5 сут	30 (17,5%)	16 (25,8%)	>0,05
Эмбрионы неудовлетворительного качества 5 сут	3 (1,8%)	1 (1,6%)	>0,05
Эмбрионы отличного качества 6 сут	5 (2,9%)	1 (1,6%)	>0,05
Эмбрионы хорошего качества 6 сут	11 (6,4%)	5 (8,1%)	>0,05
Эмбрионы удовлетворительно го качества 6 сут	32 (18,7%)	3 (4,8%)	<0,05
Эмбрионы неудовлетворительного качества 6 сут	4 (2,4%)	0 (0%)	>0,05

*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток*

Нами было выдвинуто предположение о влиянии НГЭ на скорость бластуляции эмбрионов и получении большего количества бластоцист на 6 сутки культивирования относительно группы сравнения. После статистической обработки данных не было выявлено достоверности в данном сравнении, вместе с тем снова была выявлена тенденция к изменениям в группе НГЭ по процентным соотношениям. В НГЭ — 30,4%



эмбрионов культивировались до 6 суток, тогда как в ТПФ лишь 12,9%. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6. Процент бластуляции эмбрионов в исследуемых группах

	Группа I (НГЭ) (n=171 эмбрион)	Группа II (ТПФ) (n=62 эмбриона)	p*
5 сутки	119 (69,6%)	53 (87,1%)	0,354
<b>6 сутки</b>	<b>52 (30,4%)</b>	<b>8 (12,9%)</b>	<b>0,032</b>

*Данные представлены как доли эмбрионов на разные сутки культивирования в % и абсолютное число эмбрионов в сравниваемых группах, \* критерий Хи-квадрат*

Относительный риск формирования бластоцист хорошего и отличного качества на 6-е сутки культивирования у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения составляет 2,357, ДИ 95% [1,18–4,67].

Из всего вышперечисленного можно сделать вывод, что тенденция к замедлению бластуляции, возможно, приводит к получению у пациенток с НГЭ эмбрионов с более низким морфологическим качеством в сравнении с группой ТПФ.

При дальнейшем анализе генетического статуса полученных бластоцист в группах женщин с НГЭ и ТПФ выявлено, что отсутствует достоверная разница в получении эуплоидных бластоцист в исследуемых группах женщин. Есть тенденция в большем числе генетически аномальных эмбрионов при НГЭ, однако данные недостоверны. Полученные данные могут быть обусловлены более частым проведением биопсии бластоцист на 6-е сутки культивирования, которые, как известно, содержат большее число мутаций. Результаты представлены в таблице 7.

Важно, что в группе НГЭ процент женщин, у которых в результате получились только анеуплоидные эмбрионы (29,9%), значительно больше, чем в группе ТПФ (14,7%), но из-за маленькой выборки пациентов не было

получено статистической достоверности.

**Таблица 7. Генетический статус эмбрионов в исследуемых группах по результатам ПГТ-А**

<b>Показатель</b>	<b>Группа I (НГЭ) n=87</b>	<b>Группа II (ТПФ) n=34</b>	<b>p</b>
Количество анеуплоидных эмбрионов	1,0 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	0,91
Количество эуплоидных эмбрионов	1,0 (0,0-2,0)	2,0 (1,0-3,0)	0,06
Количество пациенток, имеющих только анеуплоидные эмбрионы	26 (29,9%)	5 (14,7%)	0,09

В работе были предприняты попытки сравнить эффективность применения протоколов с а-ГнРГ и ант-ГнРГ у женщин из группы НГЭ, оценив эмбриологический этап программ ВРТ. Результаты представлены в таблице 8.

При сравнении протоколов не удалось выявить статистически значимые различия в исследуемых параметрах, что свидетельствует об отсутствии влияния протокола на количество и качество эмбрионов при НГЭ и согласуется с некоторыми литературными данными.

Эффективность всех программ ВРТ оценивали по частоте имплантации из расчета на перенос эмбриона, частоте наступления клинической беременности (ЧНБ), ее прогрессирования и частоте живорождения. Из проанализированных 121 супружеских пар в группе НГЭ перенос эуплоидной бластоцисты был осуществлен у 61 женщины (из 87), в группе ТПФ — у 29 пациенток (из 34). Клинические результаты представлены в таблице 9.

**Таблица 8. Сравнение эмбриологических показателей при различных протоколах овариальной стимуляции у женщин с НГЭ**

	<b>аГнРГ n=13 26 эмбрионов</b>	<b>антГнРГ n=74 222 эмбриона</b>	<b>p</b>
Количество ОКК	7 (5–13)	10 (7–15)	>0,05
Количество зигот	5 (3–5)	7 (5–10)	>0,05
Количество бластоцист	1 (1–2)	3 (1–4)	>0,05
Эуплоидные эмбрионы	13 (50%)	109 (49,1%)	>0,05
Анеуплоидные эмбрионы	13 (50%)	113 (50,9%)	>0,05
Эмбрионы отличного качества	8 (30,8%)	71 (32%)	>0,05
Эмбрионы хорошего качества	13 (50%)	80 (36%)	>0,05
Эмбрионы удовлетворительного качества	3 (11,5%)	66 (29,7%)	>0,05
Эмбрионы неудовлетворительного качества	2 (7,7%)	5 (2,3%)	>0,05
Переносы эмбрионов	5 (38,5%)	35 (47,3%)	>0,05
Имплантация	3 (60%)	23 (65,7%)	>0,05
Исходы	3 (60%)	20 (57,1%)	>0,05
Пациенты, у которых только анеуплоидные эмбрионы	5 (38,5%)	21 (28,4%)	>0,05

*Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом, тест Манна-Уитни; \*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток*

**Таблица 9. Исходы программ ВРТ у пациенток в группах сравнения при переносе эуплоидного эмбриона**

	<b>Группа I (НГЭ) (n=61)</b>	<b>Группа II (ТПФ) (n=29)</b>	<b>ОР, ДИ</b>
Клиническая беременность, %	40,9% (25/61)	48,2% (14/29)	0,849 ДИ:0,524–1,375
Ранние потери (до 12 недель гестации), %	16% (4/25)	14,2% (2/14)	1,12 ДИ: 0,234–5,363
Частота живорождения в расчете на беременность, %	84% (21/25)	85,7% (12/14)	0,875 ДИ: 0,479–1,598

*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, ОР – относительный риск с 95% доверительным интервалом*

При сравнении указанных параметров между группами не найдено достоверных различий, однако вновь можно наблюдать выраженные различия в процентных соотношениях показателей эффективности в пользу группы ТПФ. Частота имплантации, как и клинической беременности, в группе НГЭ составила 40,9%, в группе ТПФ — 48,2%. Частота живорождения была сопоставима в двух сравниваемых группах: у женщин с НГЭ — 84%, при ТПФ — 85,7%.

Учитывая факт индивидуального подбора протокола подготовки эндометрия в программе переноса размороженного эмбриона для пациенток в обеих группах (перенос проводился в ЕЦ или на фоне ЦГТ), дополнительно была проведена оценка эффективности выбранных протоколов внутри групп сравнения. Данные представлены в таблице 10.

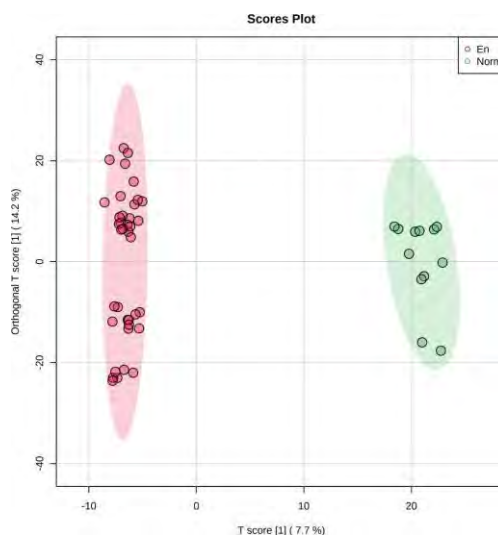
Ни в группе НГЭ, ни при ТПФ не было выявлено достоверных различий между переносом размороженного эуплоидного эмбриона в ЕЦ и на фоне ЦГТ. Данные результаты указывают на отсутствие особенных схем подготовки эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в криопротоколах.

Таблица 10. Сравнение эффективности протоколов подготовки эндометрия в программах переноса размороженного эуплоидного эмбриона в анализируемых группах женщин

<b>Группа пациенток с НГЭ</b>			
<b>Показатель</b>	<b>ЕЦ n=30</b>	<b>ЦГТ n=31</b>	<b>P*, критерий Хи-квадрат</b>
Клиническая беременность, %	40,0% (12/30)	41,9% (13/31)	>0,05
Ранние репродуктивные потери (до 12 недель гестации) в расчете на беременность, %	16,6% (2/12)	15,3% (2/13)	>0,05
Частота живорождения в расчете на беременность, %	83,3% (10/12)	84,6% (11/13)	>0,05
<b>Группа пациенток с ТПФ</b>			
<b>Показатель</b>	<b>ЕЦ n=11</b>	<b>ЦГТ n=18</b>	<b>P*, критерий Хи-квадрат</b>
Клиническая беременность, %	63,6% 7/11	38,8% (7/18)	>0,05
Ранние потери (до 12 недель гестации), %	28,5% (2/7)	0	>0,05
Частота живорождения в расчете на беременность, %	71,4% (5/7)	100%	>0,05

Для поиска причин изменений показателей эмбриологического этапа программ ВРТ у женщин с НГЭ был проведен метаболомный анализ собранной фолликулярной жидкости. Суммарно было отобрано 72 образца

ФЖ, из которых проанализированы только те женщины, у которых были получены эуплоидные эмбрионы по результатам ПГТ-А: 27 образцов от женщин с НГЭ и 6 — женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. После начальной обработки масс-спектров было детектировано 3103 молекулярных иона. Методом многомерной статистики OPLS-DA была показана четкая кластеризация образцов на две области, соответствующие группам сравнения (рисунок 7).



**Рис.7.** Кластеризация образцов фолликулярной жидкости методом OPLS-DA. En – образцы ФЖ пациенток с эндометриозом, Norm – образцы пациенток без эндометриоза. Закрашенные области соответствуют статистически значимым областям

Поиск компонентов ФЖ, статистически значимо различающихся в группах сравнения с кратностью изменений  $\geq 2$ , выявил 285 молекулярных ионов. Для идентификации данных молекулярных ионов был произведен поиск в базе данных химических структур метаболитов человека (HMDB), в результате которого был получен список потенциальных биомаркеров. В частности, было выявлено большое количество липидов различных классов.

Для поиска вероятных метаболических путей, в которые вовлечены компоненты, обуславливающие различия между группами, был проведен функциональный анализ на основе тех молекулярных ионов, которые вносят вклад в дифференцировку групп по данным OPLS-DA. Выявленные

метаболические пути показаны в таблице 11. Значение  $p$  соответствует вероятности случайным образом получить подобное пересечение набора наблюдаемых экспериментально метаболитов с метаболитами конкретного метаболического пути согласно точному тесту Фишера.

Среди выявленных путей преобладают пути, связанные с метаболизмом витаминов, липидов (глицерофосфолипидов и производных докозагексаеновой кислоты – нейростеранов), а также гликанов и гликолипидов (сильные кислоты). Из аминокислот представлен только метаболический путь тирозина.

Таким образом, анализ метаболомного профиля фолликулярной жидкости женщин с НГЭ показал существенные отличия условий формирования ооцитов внутри полости фолликула от пациенток с ТПФ.

После получения данных ПГТ-А для сравнительного анализа результатов метаболического профиля были выбраны образцы, принадлежащие только эуплоидным эмбрионам группы НГЭ и группы контроля: всего 19 образцов сред культивирования (13 — НГЭ, 6 — группа контроля).

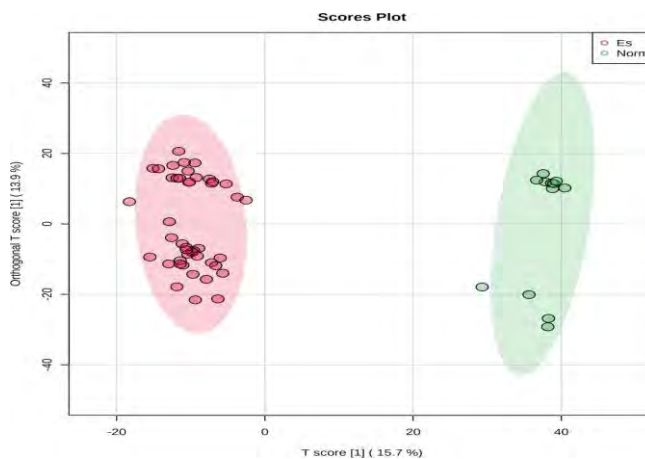
После начальной обработки масс-спектров было детектировано 6923 молекулярных иона. Для первичной оценки распределения образцов и выявления выбросов был использован метод OPLS-DA, который выявил хорошую кластеризацию образцов в зависимости от наличия или отсутствия НГЭ. Данные представлены на рисунке 9. Подобная картина свидетельствует о выраженных отличиях метаболомных профилей сред культивирования исследуемых групп эмбрионов.

Таблица 11. Метаболические пути, наиболее вероятно соответствующие найденным в ФЖ потенциальным метаболитам, определяющим различия между группами НГЭ и контроля согласно модели MFN

Метаболический путь	Метаболитов найдено	P-значение*
Vitamin B3 (nicotinate and nicotinamide) metabolism	1	0,02
Tyrosine metabolism	4	0,04
Sialic acid metabolism	3	0,09
C21-steroid hormone biosynthesis and metabolism	1	0,09
D4&E4-neuroprostanes formation	2	0,16
Vitamin B1 (thiamin) metabolism	2	0,16
Glycerophospholipid metabolism	2	0,26
Squalene and cholesterol biosynthesis	2	0,65
Carnitine shuttle	3	0,65
Glycolysis and Gluconeogenesis	2	0,65

*\*p-value (значение) – вероятность наблюдения подобных данных (списка метаболитов) при отсутствии какой-либо взаимосвязанной метаболической активности (активного метаболического пути), полученная с помощью точного теста Фишера.*





**Рис.8.** Кластеризация образцов методом OPLS-DA. Es – образцы сред культивирования эмбрионов пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения, Norm – образцы сред культивирования эмбрионов пациенток без эндометриоза. Закрашенные области соответствуют статистически значимым областям

В результате были отобраны потенциальные биомаркеры, представляющие наибольший интерес. Обращает на себя внимание отсутствие в списках различающихся масс аминокислот, что указывает на идентичный уровень их потребления из среды эмбрионами обеих групп. В то же время было выявлено большое количество липидов и их производных — жирные кислоты фосфатидилэтанолламины, фосфатидилсерин, моно- и диглицериды, а также ряд других биологически активных молекул. Всего было отобрано 1213 таких молекулярных ионов. Для идентификации был произведен поиск в базе данных метаболитов человека (HMDB).

Для поиска вероятных метаболических путей, в которые вовлечены метаболиты, обуславливающие различия между группами, был проведен функциональный анализ с использованием базы данных Metaboanalyst. Для функционального анализа отбирались молекулярные ионы, которые внесли наибольший вклад в различия между группами, согласно данным многомерной статистики OPLS-DA. Выявленные метаболические пути представлены в таблице 12. Значения p получены с помощью точного теста Фишера. В эмбриональных питательных средах было выявлено большее количество метаболитов, и, соответственно, метаболических путей, изменяющихся между группами. Так, результаты включали пути метаболизма аминокислот (метионина, цистеина, триптофана), сахаров и

жирных кислот. Также выявлялись пути метаболизирования лекарственных средств и ксенобиотиков.

**Таблица 12. Список метаболических путей, включающих потенциальные метаболиты, идентифицированные в средах культивирования эмбрионовисследуемых групп**

<b>Метаболический путь</b>	<b>Метаболитов найдено</b>	<b>P-значение*</b>
C21-steroid hormone biosynthesis and metabolism	7	0,02
Drug metabolism - cytochrome P450	7	0,035
Starch and Sucrose Metabolism	1	0,09
Methionine and cysteine metabolism	5	0,01
Arachidonic acid metabolism	4	0,11
Xenobiotics metabolism	2	0,11
Drug metabolism - other enzymes	3	0,14
Leukotriene metabolism	3	0,16
Tryptophan metabolism	7	0,17
De novo fatty acid biosynthesis	2	0,21
Fatty acid activation	2	0,21
Glycosphingolipid metabolism	3	0,21
Bile acid biosynthesis	3	0,21
Linoleate metabolism	3	0,23
Vitamin E metabolism	3	0,3
Fructose and mannose metabolism	2	0,33
Galactose metabolism	2	0,33
Hexose phosphorylation	2	0,33
Androgen and estrogen biosynthesis and metabolism	3	0,37

*\*P-value (значение) – вероятность наблюдения подобных данных (списка метаболитов) при отсутствии какой-либо взаимосвязанной метаболической активности (активного метаболического пути), полученная с помощью точного теста Фишера.*

## ВЫВОДЫ

1. При стимуляции функции яичников препаратами гонадотропинов число получаемых ооцит-кумулюсных комплексов у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения достоверно ниже по сравнению с пациентками с трубно-перитонеальным фактором бесплодия: Me 10,0 против Me 12,0 ( $p=0,046$ ) при достоверно не различающихся параметрах овариального резерва.

2. Частота оплодотворения в программах лечения бесплодия методами ВРТ у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения достоверно снижена в 1,2 раза по сравнению с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

3. При наружном генитальном эндометриозе I и II стадии распространения у молодых женщин риск появления анеуплоидных эмбрионов в программах ВРТ с ПГТ-А не отличается от такового у женщин с трубно-перитонеальным фактором и составляет 49,1% против 50%

4. У женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения происходит задержка формирования бластоцист. К 5-м суткам культивирования только 26,9% эмбрионов достигают стадии бластоцисты, тогда как в ТПФ — 40,3%. Замедление роста эмбрионов связано с более частыми морфологическими изменениями женских половых клеток при НГЭ – в 1,3 раза.

5. Эффективность криопереноса эмбриона в естественном овуляторном менструальном цикле не отличается от данного показателя при переносе на фоне циклической гормональной терапии.

6. Получены статистически значимые различия в метаболических путях тирозина, метионина, цистеина и триптофана в фолликулярной жидкости женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения по сравнению с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

7. У женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии

распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ в отработанной культуральной среде были выявлены достоверно сниженные уровни анандамида (AEA) и 2-арахидоноилглицерина по сравнению с пациентками с ТПФ.

8. В средах культивирования, полученных от пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения, было зафиксировано повышение уровня арахидоновой кислоты, а также снижение уровня докозапентаеновой кислоты (омега-3) и окисленных производных докозагексаеновой кислоты (омега-3), что может свидетельствовать о нарушении баланса продукции медиаторов липидной природы.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленное в диссертации сниженное число получаемых ооцит-кумулюсных комплексов у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения диктует необходимость более раннего обращения к врачу-репродуктологу для решения вопроса бесплодия, а также корректировки стартовой дозы гонадотропинов для повышения эффективности лечения.

2. Сниженная частота оплодотворения (77,5%) у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ требует проведения разъяснительных бесед врача-репродуктолога перед вступлением супружеской пары в цикл ЭКО.

3. Повышенная суммарная доза гонадотропинов у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения по сравнению с трубно-перитонеальных фактором (1800 МЕ против 1500 МЕ) при одинаковом среднем числе получаемых зрелых ооцитов диктует необходимость проведения стимуляции функции яичников, отказ от лечения в естественном менструальном цикле.

4. Наличие у женщины наружного генитального эндометриоза I и II стадии распространения требует продленного культивирования эмбрионов до 6 суток для увеличения числа бластоцист, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации, поскольку у таких пациенток происходит замедление процессов раннего эмбриогенеза.

5. Выявленные изменения метаболитов витаминов А, В, D и Е в фолликулярной жидкости и отработанных средах культивирования эмбрионов в группе женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения указывают на целесообразность проведения своевременной витаминотерапии, направленной на снижение общего воспалительного фона в организме.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности метаболомного профиля фолликулярной жидкости и сред культивирования эмбрионов пациенток с наружным генитальным эндометриозом. **Ибрагимова Л.К.**, Смольникова В.Ю., Эльдаров Ч.М., Бобров М.Ю., Агаджанян Д.С., Романов Е.А., Калинина Е.А. **Акушерство и гинекология.** 2021; №11: С. 114-124

2. Роль продуктов метаболизма ооцитов и эмбрионов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом в успешной имплантации эмбрионов/ Смольникова В.Ю., **Ибрагимова Л.К.**, Бобров М.Ю., Романов Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2020. № 4. С. 21-25.

3. LC-MS Analysis Revealed the Significantly Different Metabolic Profiles in Spent Culture Media of Human Embryos with Distinct Morphology, Karyotype and Implantation Outcomes/ Eldarov C.; Gamisonia A.; Chagovets V.; **Ibragimova L.**; Yarigina S.; Smolnikova V.; Kalinina E.; Makarova N.; Zgoda V.; Sukhikh G.// **International Journal of Molecular Sciences.** 2022. № 23,2706.

4. Реимплантационное генетическое тестирование эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с наружным генитальным эндометриозом/ Кулакова Е.В., Непша О.С., Екимов А.Н., Драпкина Ю.С., Макарова Н.П., **Ибрагимова Л.К.**, Сысоева А.П., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2021. № 11. С. 104-112.