

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ  
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

*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

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:**

**доктор медицинских наук, доцент  
Смольникова Вероника Юрьевна**

**Москва – 2023**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ У ЖЕНЩИН С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ I И II СТАДИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Патогенетические аспекты бесплодия у женщин с наружным генитальным эндометриозом .....	13
1.2. Особенности проведения программ лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом .....	19
1.3. Оценка метаболического профиля фолликулярной жидкости и сред культивирования у женщин с наружным генитальным эндометриозом .....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	38
2.1. Отбор супружеских пар в исследование .....	38
2.2. Дизайн исследования.....	39
2.3. Обследование супружеских пар перед вступлением в программу лечения бесплодия методами ВРТ .....	43
2.4. Протокол стимуляции функции яичников .....	48
2.5. Процедура трансвагинальной пункции фолликулов .....	49
2.6. Оплодотворение методом ИКСИ и оценка эмбрионов <i>in vitro</i> .....	49
2.7. Биопсия бластоцист и преимплантационное генетическое тестирование на анеуплодии .....	50
2.8. Размораживание эуплоидных эмбрионов и перенос в полость матки...	51
2.9. Диагностика наступления беременности .....	52
2.10. Специальные методы исследования .....	52
2.11. Статистический анализ полученных данных .....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
3.1. Клинико-anamнестические характеристики супружеских пар, включенных в исследование .....	58
3.2. Характеристика циклов стимуляции функции яичников и параметров раннего эмбриогенеза в программе ВРТ у женщин исследуемых групп.....	63
3.3. Особенности клинического и эмбриологического этапа программ ВРТ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом I - II стадии распространения при разных протоколах стимуляции функции яичников.....	71

3.4. Оценка имплантации эмбриона и протоколов подготовки эндометрия у пациенток исследуемых групп.....	72
3.5. Особенности метаболомного профиля фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп в программах ВРТ.....	75
3.6. Результаты анализа метаболомного профиля отработанных культуральных сред в программах ВРТ.....	79
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	85
ВЫВОДЫ.....	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Наружный генитальный эндометриоз — распространенное гинекологическое заболевание, которое тесно связано с бесплодием. Примерно 30–50% женщин с эндометриозом имеют проблемы с деторождением, а диагноз «наружный генитальный эндометриоз» врачи ставят 20–50% бесплодным женщинам [1]. Хотя основной механизм этой связи до сих пор не выяснен, были предложены некоторые вероятные причины, такие как воспаление и иммунная дерегуляция, окислительный стресс, аномальные сигнальные пути прогестерона и эстрогена и анатомические аномалии малого таза [2]. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) стали одним из ключевых методов преодоления бесплодия у пациенток с эндометриозом. Качество эмбриона и рецептивность эндометрия, которым, как полагают, вредит эндометриоз, являются критическими факторами в ВРТ [2, 3].

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

Как показывают научные исследования, женщины с эндометриозом имеют более низкий процент зрелых и морфологически нормальных ооцитов и более низкое качество эмбрионов [4]. Тем не менее, не было обнаружено существенной разницы с точки зрения реакции яичников или качества ооцитов и эмбрионов в пораженных эндометриозом яичниках по сравнению с контралатеральным яичником без эндометриомы [5]. Что касается рецептивности эндометрия, в некоторых исследованиях сообщалось, что эндометриоз влияет на рецептивность эндометрия, что приводит к снижению частоты имплантации и прогрессирования беременности [6]. Напротив,

Miravet-Valenciano et al. продемонстрировали, что эндометриоз не нарушает рецептивность эндометрия на основании транскриптомных данных при переносе эмбрионов, полученных из донорских ооцитов [7].

Несмотря на то, что во многих исследованиях изучали связь между эндометриозом и исходами ВРТ, последствия эндометриоза остаются неясными. В частности, лишь немногие исследования были одновременно сосредоточены на качестве эмбрионов и исходах программ ВРТ. С развитием молекулярных методов исследования в клинической практике стало появляться все больше методов, позволяющих изучить патогенез наружного генитального эндометриоза у женщин с бесплодием. Особенно это касается программ переноса размороженного эмбриона, которому было проведено преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А).

С широким клиническим распространением предимплантационного генетического тестирования (ПГТ) предполагали, что найдено решение для селективного выбора эмбриона для переноса в программах ВРТ. ПГТ позволяет провести анализ полного хромосомного набора путем сравнительной геномной гибридизации или методами высокопроизводительного секвенирования нового поколения, что увеличило частоту наступления беременности. Однако, это не решает полностью проблем негативных исходов программ ВРТ, так как частота наступления беременности не превышает 50% даже при наличии ультразвуковой картины нормальных параметров прегравидарного эндометрия и эуплоидного хромосомного набора переносимого эмбриона. Для женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения перенос эуплоидного эмбриона в полость матки также не приводил к гарантированной беременности [8]. Многие исследователи выступают против преимплантационного генетического тестирования, поскольку метод является дорогостоящей инвазивной диагностической процедурой.

Именно поэтому необходимо изучать и внедрять новые неинвазивные методы исследования эмбриона у пациентов с бесплодием в программах ВРТ,

которые позволят увеличить частоту имплантации и наступления беременности, а также позволят понимать патогенетические механизмы развития эмбрионов *in vitro* при различной гинекологической патологии.

Уникальными объектами исследования являются метаболомные профили фолликулярной жидкости, полученной в ходе трансвагинальной пункции яичников, и сред культивирования эмбрионов различных стадий развития, так как они несут в себе информацию об энергообмене, метаболической активности и состоянии сигнальных систем эмбриона. Оценка молекулярных составляющих питательных сред является перспективным направлением для поиска маркеров успешной имплантации эмбриона с последующим развитием клинической беременности и рождением здорового ребенка.

НГЭ сопровождается местной воспалительной реакцией с привлечением и активацией макрофагов, выбросом цитокинов и простагландинов, высвобождением активных форм кислорода, мобилизацией антиоксидантного ответа, установлением локального окислительно-восстановительного дисбаланса с последующим повреждением липидов, белков, нуклеиновых кислот и других мишеней. Воздействие такой «токсичной» среды влияет как на качество гамет, так и на сам процесс оплодотворения, что приводит к ухудшению свойств эмбриона и влияет на его развитие [9, 10].

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

Из всего упомянутого выше можно сделать вывод, что изучение метаболомного профиля культуральных сред и фолликулярной жидкости у пациенток с наружным генитальным эндометриозом, а также прогнозирование результатов лечения бесплодия на основе выбора эмбрионов с максимальным имплантационным потенциалом является актуальным, современным и перспективным.

## **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 зуплоидного эмбриона в полость матки и обосновать полученные результаты методами метаболомного профилирования.

## **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Оценить клиничко-анамнестические данные пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.
2. 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.
3. 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.
4. Проанализировать метаболомный профиль фолликулярной жидкости женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения.
5. Провести сравнительный анализ метаболомного профиля отработанных культуральных сред от зуплоидных эмбрионов, полученных от пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения и женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.
6. 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

Проспективное 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 ploидность 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 акушерства и гинекологии.

## **СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

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.

## **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 заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (17.04.2023 г., протокол №5).

## **МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Методология заключалась в системном подходе и комплексном анализе клинических, эмбриологических и метаболомных данных у супружеских пар в программах лечения бесплодия методами ВРТ и их сопоставлении с опубликованными литературными данными как российских, так и зарубежных исследователей.

Пациенты были обследованы согласно действующим нормативно-правовым актам. В рамках диссертации был проведен критический анализ

отечественных и зарубежных работ в области влияния наружного генитального эндометриоза I и II стадии распространения на эффективность лечения бесплодия методами ВРТ. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. Анализируемые пациенты были стратифицированы на группы в зависимости от факторов бесплодия, исходов программ лечения, протоколов овариальной стимуляции и подготовки эндометрия.

Статистическая обработка полученных данных выполнена на высоком уровне с получением достоверных результатов, соответствующих принципам доказательной медицины.

### **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.).

### **ПУБЛИКАЦИИ**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, все входят в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **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.

## **ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ У ЖЕНЩИН С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ I И II СТАДИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

### **1.1. Патогенетические аспекты бесплодия у женщин с наружным генитальным эндометриозом**

Среди различных форм эндометриоза частота встречаемости наружного генитального эндометриоза (НГЭ) составляет 5–10% у женщин репродуктивного возраста, а выявление данной патологии при лапароскопии, в том числе проводимой с целью уточнения причины бесплодия, достигает 20–55%. Одной из наиболее широко применяемых в мировой практике стала предложенная в 1979 году Американским обществом фертильности (с 1995 года — Американское общество по репродуктивной медицине) и пересмотренная в 1996 году классификация, основанная на подсчете общей площади поражения в баллах [11]:

I стадия — минимальный эндометриоз (1–5 баллов);

II стадия — легкий эндометриоз (6–15 баллов);

III стадия — умеренный эндометриоз (16–40 баллов);

IV стадия — тяжелый эндометриоз (более 40 баллов).

Следует отметить, что среди женщин, обращающихся в центры ВРТ для проведения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), более 30% пациенток имеют НГЭ [12]. НГЭ у женщин приводит к нарушению репродуктивной функции, а также к позднему и часто неэффективному использованию методов ВРТ для лечения бесплодия и рождения здорового ребенка [13].

Согласно последним опубликованным в 2023 году научным данным, патогенез эндометриоза до сих пор является дискуссионным [14]. До сих пор рассматривают несколько основных теорий: ретроградная менструация, миграция клеток эндометрия вне полости матки через лимфоток, нарушения иммунной/эндокринной системы и теория эмбриональных клеток.

Теория о ретроградной менструации хорошо известна как теория Сэмпсона. Она остается актуальной до сих пор, хотя впервые была описана в 1925 году. Основная идея заключается в том, что менструальная кровь, содержащая клетки эндометрия, извергается через открытые фаллопиевы трубы в брюшную полость, где может произойти их имплантация. После имплантации развитие и рост очага поражения поддерживается ангиогенезом. Это возможно благодаря активированным перитонеальным макрофагам, которые продуцируют ангиогенные факторы, например эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF). Проблема этой теории заключается в том, что ретроградная менструация может объяснить эндометриоз яичников и поверхностной брюшины, но не глубокий инфильтративный эндометриоз или поражения за пределами брюшной полости [15].

Однако несколько исследований показывают, что отток менструальной крови физиологичен для женщин с проходимыми маточными трубами, и у большинства из них (76–90%) наблюдаются ретроградные менструации без дальнейшего развития эндометриоза [16]. Случаи, когда эндометриоз развивается у женщин с ретроградной менструацией, могут быть объяснены эпидемиологическими исследованиями, которые выявляют факторы риска эндометриоза — короткий менструальный цикл, более продолжительные менструальные выделения и обструкцию маточного оттока.

В 1927 году Сэмпсон предложил еще один патогенетический механизм — теорию «метастатического эндометриоза». Эта теория предполагает, что небольшое количество ткани эндометрия может распространяться по лимфатическим сосудам, дренирующим матку, во время менструации. Преимущество теории «доброкачественного метастазирования» заключается в том, что этот патогенетический механизм может объяснить возникновение эндометриоза в лимфатических узлах и отдаленных локализациях, таких как легкие, поскольку лимфатические капилляры обнаружены почти во всех органах. Исследования лимфангиогенеза обнаружили, что существует нарушение регуляции экспрессии лимфангиогенных факторов роста и их

рецепторов в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом. Основными промоторами лимфангиогенеза в эндометрии являются VEGF-C и VEGF-D, которые активируются провоспалительными цитокинами, а именно интерлейкином  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), фактором некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-7 и CD74. Кроме того, плотность лимфатических микрососудов эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом также повышена. Поэтому эти изменения в совокупности могли бы способствовать попаданию ткани эндометрия в лимфатическую циркуляцию. Однако до сих пор неясно, как это нарушение регуляции на самом деле влияет на развитие эндометриоза.

Воспаление, вызванное нарушением иммунной регуляции, является одним из основных механизмов, участвующих в заболеваниях, при которых происходит клеточная пролиферация и инфильтрация. В случае эндометриоза провоспалительные пути блокируют функции механизмов апоптоза и потенциально «вредные» клетки прилипают к отдаленным участкам. Иммунными клетками, участвующими в формировании и дальнейшем развитии поражений эндометрия, являются макрофаги, нейтрофилы, НК-клетки, дендритные и Т-клетки [14].

Теория эмбриональных клеток — это своего рода теория метаплазии. Из нее следует, что остатки эмбриональных клеток из протоков Вольфа или Мюллера могут дифференцироваться в эндометриодные поражения [15]. Предполагается, что некоторые изменения в дифференцировке клеток или перемещении мюллеровых протоков во время эмбриогенеза плода могут поддерживать распространение эмбриональных клеток — примордиальных клеток эндометрия. Как правило, эти клетки расположены в задней части тазового дна и остаются неактивными до наступления половой зрелости, а затем, с началом выработки эстрагенов, начинается процесс формирования эндометриодных поражений.

На основании вышеизложенных концепций понятно, что патогенез эндометриоза сложен и включает в себя множество факторов и процессов, которые происходят одновременно. Существует множество взаимодействий

иммунной системы, гормонов, генов, местных и стволовых клеток — все они оказывают влияние на развитие эндометриоза и его дальнейшее прогрессирование. В последние годы было изучено много теорий, но нет единой теории, которая могла бы объяснить все аспекты эндометриоза. Будущая концепция эндометриоза, вероятно, будет включать элементы всех перечисленных патогенетических теорий. Именно поэтому до настоящего времени остается неизвестным влияние эндометриоза на нарушения репродуктивной функции женщин. Особенно это касается пациенток клиник лечения бесплодия методами ВРТ. Исследователи активно изучают влияние НГЭ как на клинические, так и эмбриологические показатели в циклах лечения. В ряде работ выдвинуты гипотезы об изменении количества и качества ооцитов у доноров яйцеклеток, в анамнезе у которых был эндометриоз [17]. Однако данный вопрос остается дискуссионным. Так в исследовании *Simón C. et al.* сообщалось, что реципиенты донорских ооцитов с эндометриозом, получавшие яйцеклетки от фертильных доноров, имели те же показатели имплантации и беременности, что и реципиенты без него [18]. С течением времени начали появляться работы, в которых было показано, что у реципиентов ооцитов, полученных от доноров с эндометриозом, частота имплантации по сравнению с контрольной группой была значительно ниже [19]. Такие результаты могут свидетельствовать о том, что именно ухудшение качества ооцитов и, соответственно, эмбрионов, а не восприимчивость эндометрия, играет основную роль в снижении частоты имплантации.

Группа *Nisolle M.* и его коллеги продемонстрировали, что не только сумма зрелых ооцитов и эмбрионов хорошего морфологического качества, но и частота оплодотворения и бластуляции были ниже у женщин с эндометриозом по сравнению с группой женщин, причиной бесплодия у которых был мужской фактор [20].

Изменение иммунного профиля, наблюдаемое у женщин с НГЭ, может играть важную роль в бесплодии, снижая качество гамет, скорость их передвижения и имплантации, а также являться одним из пусковых факторов



невынашивания беременности [21]. Увеличение лейкоцитарной и, в частности, макрофагальной [22] активности в эндометриодном очаге способствует мощному высвобождению высокореактивных свободных радикалов и развитию окислительного стресса [23]. Повышенные уровни провоспалительных факторов оказывают токсическое действие на ооциты, их транспортировку и имплантацию эмбрионов, а также на раннее эмбриональное развитие, увеличивая вероятность самопроизвольного аборта. Кроме того, повышенный уровень простагландинов может вызывать сокращения матки, что негативно сказывается на пролонгировании беременности [24].

Эндометриодные кисты яичников (ЭКЯ) встречаются у 17–44% женщин с НГЭ. Полагают, что ЭКЯ оказывают негативное влияние на функциональное состояние яичников, приводя к изменению состава фолликулярной жидкости (ФЖ). Изменения состава ФЖ провоспалительного характера оказывают негативное влияние на процессы оогенеза, вызывая уменьшение размеров доминантного фолликула, повышение апоптотического индекса клеток кумулюса, а также дистрофические процессы в клетках гранулезы. Кроме того, любое оперативное вмешательство по поводу ЭКЯ ведет к снижению овариального резерва.

По мнению ряда авторов, ооциты от женщин с эндометриозом демонстрируют другое поведение транскриптома с дифференциально экспрессируемыми генами по сравнению с женщинами без него. Вовлеченные в патогенез пути включают ключевые биологические процессы и молекулярные функции, связанные с метаболизмом стероидов, реакцией на окислительный стресс и регуляцию роста клеток, что может объяснить снижение качества ооцитов [25].

Литературные данные об эмбриологических параметрах циклов ВРТ у женщин с НГЭ противоречивы. Возможно, такое несоответствие связано с методическими различиями. Кроме того, некоторые из этих исследований характеризуются рядом ограничений: во-первых, малым размером выборки,

приводящим к недостатку статистической мощности, и, во-вторых, отсутствием сопоставления возраста, количества аспирированных ооцитов или поправок на искажающие факторы [26].

Следует признать, что имеющиеся критерии оценки качества эмбрионов носят субъективный характер, так как зависят от нескольких факторов, включая опыт эмбриолога и функциональные возможности оснащения и не дают гарантий успешного наступления и развития беременности.

Благодаря появлению новой технологии time-lapse-микроскопии сегодня появилась возможность наблюдать за развитием эмбриона практически непрерывно [27]. В CO<sub>2</sub>-инкубатор в лаборатории помещается специальная видеокамера, которая через определенные интервалы времени делает фотографии эмбрионов и впоследствии монтируется видеоролик развития с 1-х суток до 5-х. Получается «фильм» о развитии каждого эмбриона с момента оплодотворения до стадии бластоцисты.

Преимуществом time-lapse-микроскопии является появление возможности оценивать не только морфологию эмбриона, но и временные интервалы делений дробления. Соотнося полученную запись с имеющимися данными о нормальном временном ходе развития, можно выбрать для переноса эмбрион не только с лучшими морфологическими характеристиками, но и с наиболее оптимальной временной шкалой развития.

Оценка качества, согласно морфологическим критериям, является самым распространенным методом выбора эмбриона для селективного переноса, но он не предоставляет данных о физиологии развивающегося эмбриона и его хромосомном наборе. Достоверно известно, что в полость матки может быть перенесен эмбрион высокого морфологического качества («отличного» или «хорошего») и при этом нет имплантации, так как вполне вероятно, что у них имеется анеуплоидный набор хромосом, но также при «удовлетворительном» качестве эмбриона может произойти имплантация и рождается здоровый ребенок. Именно поэтому в последние годы для улучшения результатов программ ВРТ чаще стало использоваться преимплантационное генетическое

тестирование (ПГТ). ПГТ – это метод отбора эмбрионов *in vitro* с целью профилактики рождения детей с врожденными и наследственными заболеваниями [28].

Анеуплоидии считаются одной из основных причин, снижающих частоту имплантации, кроме того, они ассоциированы с высоким уровнем ранних потерь беременности [29]. Значительная часть анеуплоидных эмбрионов способна достичь самых высоких баллов по морфологической шкале, а некоторые эуплоидные эмбрионы часто характеризуются плохой морфологией. ПГТ направлено на отбор и перенос в полость матки только эмбрионов с нормальным набором хромосом, что позволяет повысить шансы не только на наступление беременности, но и рождение здорового ребенка [30].

Несмотря на перспективность и результативность, метод ПГТ весьма трудоемкий и дорогостоящий. В работе Кулаковой с соавторами было показано, что при НГЭ I и II стадии распространения применение ПГТ-А является клинико-экономически невыгодной стратегией [8]. Более того, существуют исследования, которые показывают, что применение ПГТ не дает достоверного улучшения эффективности программ ВРТ ни за счет повышения частоты живорождения, ни за счет снижения частоты самопроизвольных выкидышей [9].

## **1.2. Особенности проведения программ лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом**

Согласно научным данным, эндометриоз может вызывать различные изменения в женской репродуктивной системе, однако эмбриологические и клинические исходы в исследованиях показывают противоречивые результаты в отношении частоты оплодотворения, последующего дробления и имплантации. Вопрос о том, оказывает ли наличие эндометриоза негативное влияние на компетентность ооцитов, развитие эмбриона, а также на его качество, остается спорным. Как правило, качество ооцитов изучается

косвенно с помощью неинвазивных процедур, таких как оценка кумулюсных клеток, окружающих ооциты, и/или анализ фолликулярной жидкости [31]. Однако нет уверенности в том, что эти подходы действительно отражают качество и «компетентность» ооцита. По мнению некоторых авторов, морфология ооцитов также может быть неинвазивным маркером их качества [32]. Ооцит с «идеальной» морфологией должен соответствовать критериям созревания ядра и иметь нормальный размер, цитоплазму, толщину блестящей зоны и перивителлиновое пространство [33].

Большинство исследований, оценивающих качество ооцитов при эндометриозе, в основном были сосредоточены на уровне незрелости ооцитов, а не на морфологических аспектах [34]. Тем не менее, некоторые авторы показали более высокую распространенность морфологических изменений ооцитов, таких как наличие темных центральных грануляций, аномальной прозрачной зоны и/или других интра- и экстрацитоплазматических аномалий [35]. Однако эти исследования проводились на небольших выборках и каждое из них исследовало лишь ограниченное число морфологических аномалий.

Lisa Boucret et al. провели ретроспективное когортное исследование, направленное на оценку влияния НГЭ на качество эмбрионов и результаты ЭКО [36]. Было оценено 1124 цикла ВРТ, в том числе 155 циклов у женщин с эндометриозом и 969 — без эндометриоза. Авторы обнаружили, что у женщин с НГЭ было получено значительно меньшее количество ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и зрелых ооцитов, несмотря на использование более высоких доз гонадотропинов, а также значительно меньшее суммарное количество эмбрионов и эмбрионов отличного качества. Показатели живорождения при расчете на один цикл овариальной стимуляции были сопоставимы между двумя группами, но пациентки с эндометриозом имели значительно более низкий кумулятивный коэффициент живорождения из-за меньшего количества криоконсервированных эмбрионов.

Недавно проведенный мета-анализ был направлен на оценку влияния НГЭ на качество эмбрионов [37]. Основными сравниваемыми показателями

исхода программ были количество эмбрионов отличного качества, скорость дробления эмбрионов и бластуляции. Всего было проанализировано 22 исследования. По сравнению с контрольной группой женщины с НГЭ имели аналогичную частоту развития эмбрионов отличного качества (ОР=1,00; 95% ДИ 0,94–1,06), аналогичную скорость формирования эмбрионов (ОР=1,10; 95% ДИ, 0,97–1,24) и сопоставимую скорость бластуляции (ОР=1,00; 95% ДИ 0,97–1,02). У женщин с III и IV стадией НГЭ не было статистически значимой разницы в количестве эмбрионов отличного качества (ОР=1,02; 95% ДИ 0,94–1,10), скорости формирования эмбрионов (ОР=1,05; 95% ДИ, 0,97–1,14) и частоте бластуляции (ОР=1,00; 95% ДИ 0,98–1,02) по сравнению с пациентами без НГЭ. В результате были сделаны выводы о том, что НГЭ не ухудшает качество эмбрионов с точки зрения морфологии.

В некоторых исследованиях сообщается, что эндометриозные кисты яичников (ЭКЯ) отрицательно влияют не только на качество, но и на количество ооцитов, увеличивая механическое напряжение, тем самым разрушая нормальную анатомию, что приводит к нарушению кровоснабжения и иннервации [38]. Другие исследования показывают, что локальное воспаление и токсическое содержимое, такое как диффундирование свободного железа из кисты эндометриоза в близлежащую ткань яичника, приводят как к потере ооцитов, так и ухудшению качества эмбрионов [39]. В исследовании Kitajima M. et al. показано, что в яичниках с эндометриозными кистами наблюдается активация рекрутирования фолликулов и атрезия ранних фолликулов [40]. Напротив, Santulli P. и Kitajima M. в своих работах сообщили, что ЭКЯ сами по себе не связаны с бесплодием [41]. Хирургические вмешательства по поводу ЭКЯ, по мнению других исследователей, приводят к снижению овариального резерва и реактивности яичников. Кроме того, отмечается высокая частота послеоперационных рецидивов [42].

В ретроспективном когортном исследовании Yaoqiu Wu et al. попытались оценить влияние ЭКЯ на качество и количество ооцитов [43]. Всего было включено 1724 женщины, в том числе 862 женщины с

эндометриомой и 862 пациентки без нее. В результате были отмечены более низкие показатели количества антральных фолликулов при ультразвуковом исследовании (УЗИ), уровня антимюллерова гормона (АМГ), индекса чувствительности яичников (OSI), количества аспирированных и доступных для переноса эмбрионов у пациенток с ЭКЯ, зрелости и частоты оплодотворения ооцитов, частоты бластуляции, по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Кумулятивная частота живорождения у женщин с эндометриомой была ниже, чем без нее (39,32% против 46,87%,  $p = 0,002$ ). У пациенток с ЭКЯ, подвергшихся оперативному вмешательству до лечения методами ВРТ, были выше показатели получения зрелых ооцитов (86,03% против 83,42%,  $p = 0,003$ ), частоты оплодотворения (78,16% против 74,93%,  $p = 0,004$ ) и частоты развития эмбрионов отличного качества (42,94% против 39,93 %,  $p = 0,097$ ), но в этой группе было получено меньше ооцитов ( $8,01 \pm 5,70$  против  $9,12 \pm 6,69$ ,  $p = 0,013$ ), чем у женщин без операции. Однако показатели живорождения были сопоставимы между женщинами с ЭКЯ и женщинами контрольной группы, независимо от того, были ли у них в анамнезе операции на яичниках.

Также не удалось обнаружить корреляции между наличием ЭКЯ и частотой живорождения после поправки на количество перенесенных эмбрионов отличного качества и день переноса эмбрионов. Данные этого исследования подтвердили вывод о том, что эндометриоз отрицательно влияет на качество и количество ооцитов, но не на частоту наступления беременности у женщин при использовании методов ВРТ. Наличие эндометриоза ведет к снижению кумулятивной частоты рождаемости за счет уменьшения количества эмбрионов для переноса. Хирургическое иссечение эндометриомы перед программой ЭКО может незначительно улучшить качество ооцитов и частоту оплодотворения, но не частоту наступления беременности (ЧНБ).

Orazov M.R at al. в своем исследовании попытались оценить качество ооцитов у пациенток с бесплодием, ассоциированным с эндометриозом [44]. Женщины были разбиты на три группы: I ( $n=50$ ) с рецидивами односторонних

эндометриом, II (n=50) с односторонними эндометриомами после хирургического лечения и контрольную группу (n=30) с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. Клинико-морфологическая оценка качества ооцитов продемонстрировала статистически значимое увеличение количества незрелых ооцитов на стадии метафазы МI и незрелых ооцитов на стадии зародышевого пузырька у пациенток с эндометриозом по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,005$ ).

Также было отмечено ухудшение качества полученных ооцитов у пациенток с наличием ЭКЯ более 3 см в диаметре. Результаты исследования позволяют сделать вывод, что эндометриоз отрицательно влияет на качество женских гамет и овариальный резерв, тогда как цистэктомия оказывает влияние лишь на овариальный резерв.

В ретроспективном исследовании Camille Robin et al. изучали влияние эндометриоза на морфологию ооцитов при ЭКО/ИКСИ [44]. В данную работу было включено 596 женщин, а когорта зрелых ооцитов состояла из более чем 6000. Морфологическая оценка 2016 зрелых ооцитов, аспирированных в 348 циклах пациенток с эндометриозом сравнивалась с 4073 зрелыми ооцитами из 576 овариальных стимуляций без НГЭ. Для сравнения использовались индекс качества ооцитов и система оценки ооцитов на стадии МII — MOMS (MII oocyte morphological score). Сравнение групп проводили по смешанной линейной модели и по модели обобщенного оценочного уравнения со случайным эффектом «пациент» для учета того, что у 1 женщины может быть несколько попыток ВРТ. В результате авторы не обнаружили различий в оцениваемых показателях между женщинами с эндометриозом и контрольной группой ( $p = 0,084$  и  $p = 0,053$ ). Таким образом были сделаны выводы, что эндометриоз не оказывает негативного влияния на морфологию ооцитов при проведении овариальной стимуляции.

В исследовании Boynukalin F.K. была проведена оценка возможного влияния эндометриоза на раннее дробление и его скорость путем сравнения морфокинетического развития эмбрионов, полученных от пациенток

эндометриозом, с эмбрионами, полученные при трубном факторе бесплодия [4645]. Всего было оценено 82 цикла овариальной стимуляции, у 53 и 29 женщин при наличии соответствующего фактора. В общей сложности была проведена морфокинетическая оценка 439 эмбрионов благодаря технологии time-lapse микроскопии [46]. Было обнаружено, что количество аспирированных зрелых (стадии МII) ооцитов было значительно меньше у пациенток с эндометриозом ( $p < 0,01$ ). Были рассчитаны переменные динамического мониторинга развития преимплантационных эмбрионов. Время появления второго полярного тела ( $t_{PB2}$ ), время формирования отдельных пронуклеусов ( $t_{PNa}$ ), S2 (синхронность делений двух бластомеров во втором клеточном делении выражается во время между  $t_3$  и  $t_4$  — время, необходимое сестринским клеткам для деления на две новые клетки) достоверно больше в группе эндометриоза ( $p < 0,01$ ) и продолжительность первого эмбрионального клеточного цикла — ECC1 (клеточный цикл представляет собой упорядоченную последовательность событий, в которых клетка удваивает свое содержимое, а затем делится на две части) достоверно больше в группе контроля. Все остальные проанализированные ранние морфокинетические параметры не различались в исследуемых группах, что позволило сделать вывод о том, что эндометриоз преимущественно влияет на продолжительность ранних этапов развития эмбрионов.

В недавнем систематическом обзоре и метаанализе были предприняты попытки выявить изменения, характерные для различных стадии НГЭ, однако статистический анализ показал, что эти результаты следует интерпретировать с осторожностью из-за небольшого размера выборок [47]. Авторы предположили, что эндометриоз I–II стадии с большей вероятностью нарушает процессы оплодотворения и имплантации, в то время как при III–IV стадии могут оказывать более значимое влияние на репродукцию от оогенеза до беременности.

Жизнеспособность эмбриона зависит от многих факторов, причем хромосомный статус является одним из наиболее важных факторов,



определяющих его дальнейшую судьбу. Было подсчитано, что до 30% зигот человека являются анеуплоидными, причем эта цифра более чем в два раза выше у женщин старше 38 лет [48], что определяется вкладом непосредственно возраста, а именно биологическим старением яичника. Такая высокая частота мейотических ошибок определяет тяжелые клинические последствия, при этом примерно одна треть самопроизвольных прерываний беременности до 12 недель ассоциирована с наличием у эмбриона хромосомных аномалий [49].

В ретроспективном исследовании Juneau C. et al. авторы попытались определить, приводит ли эндометриоз к повышенному риску анеуплоидии эмбрионов [50]. Были протестированы 1880 бластоцист у 305 женщин с НГЭ. При сравнении частоты выявления анеуплоидии у пациенток с эндометриозом и без него не было достоверных различий (отношение шансов 0,85; 95% доверительный интервал, 0,84–0,85).

Vaiarelli A. [51] et al. в многоцентровом ретроспективном исследовании случай-контроль попытались оценить истинное влияние НГЭ на развитие ооцитов. Диагноз НГЭ (n=210) ставился на основании трансвагинальной сонографии или данных хирургического вмешательства с гистологическим подтверждением. Каждый случай был сопоставлен с контрольным (n=420) параметрами: возрастом матери на момент забора ооцитов ( $38,6 \pm 2,7$  года), количеством предыдущих неудачных попыток ЭКО ( $0,5 \pm 0,8$ ) и количеством аспирированных ооцитов метафазы II ( $6,1 \pm 3,7$  на женщину). Средняя частота формирования эуплоидных бластоцист из расчета на количество оплодотворившихся ооцитов была одинаковой в двух группах ( $18\% \pm 22\%$ ) независимо от возраста матери. Эмбриологические исходы в исследуемых группах были сопоставимы. Частота живорождений при селективном переносе эуплоидной бластоцисты также была одинаковой ( $67/158$ , 42%) у пациенток, страдающих эндометриозом, по сравнению с ( $132/327$ , 40%) группой контроля. Кумулятивная частота живорождения также была одинаковой ( $61/201$ , 30%) против ( $117/391$ , 30%) в исследуемых группах

независимо от возраста матери. По результатам исследования были сделаны выводы об отсутствии влияния эндометриоза на качество ооцитов, однако нельзя игнорировать его потенциальное влияние на количество зрелых ооцитов, полученных при проведении овариальной стимуляции. Полученные результаты требуют проведения дополнительных исследований для оценки влияния стадии эндометриоза на показатели плоидности эмбрионов.

Таким образом, данные о влиянии НГЭ на результаты лечения бесплодия методами ВРТ остаются противоречивыми. Среди множества патологических путей, которые, возможно, объясняют худшие результаты ЭКО у пациенток с таким диагнозом, были предложены гипотезы изменения мейотического веретена, впоследствии влияющие на частоту возникновения анеуплоидии [52]. Juneau C. et al. сообщили, что определенные показатели фолликулярной жидкости женщин с эндометриозом вызывают более высокие показатели мейотических аномалий в бычьих ооцитах, созревших в этой жидкости [53]. Реальный вопрос: могут ли ооциты от женщин с эндометриозом, подвергающихся ЭКО, быть более восприимчивыми к мейотическим ошибкам и хромосомной нестабильности, остается открытым.

### **1.3. Оценка метаболического профиля фолликулярной жидкости и сред культивирования у женщин с наружным генитальным эндометриозом**

В рамках улучшения исходов программ ВРТ в последние десятилетия интерес ученых направлен на создание новых неинвазивных методов с целью определения жизнеспособности эмбриона [54]. Появление «омиксных» технологий, к которым относятся геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика позволило использовать новые способы получения более четкой информации о физиологии биологических систем с относительно низкими финансовыми затратами и физическими усилиями, что, несомненно, может быть внедрено в повседневную практику отделений ВРТ для определения характерных молекулярных особенностей и специфических продуктов обмена веществ клеток и тканей репродуктивной системы

пациентов, а именно сперматозоидов, ооцитов, клеток гранулезы, эмбрионов и эндометрия.

Изучение генома открывает большие перспективы для улучшения диагностики и лечения бесплодия [55]. Благодаря проведению генетических исследований у мужчин и женщин в некоторых случаях можно точно идентифицировать наличие хромосомных перестроек в родительском кариотипе, вплоть до выявления дефекта одного гена, который может влиять на различные биологические пути, определяющие репродуктивные исходы [56]. Высокоспециализированные методы, такие как протеомика [57], позволяют охарактеризовать белковый профиль на молекулярном уровне и в настоящее время интенсивно используются для выявления диагностических и прогностических маркеров в области репродуктивной медицины [58]. Достижения в этой быстро развивающейся области позволяют лучше идентифицировать белки различных биологических сред и определить, как их присутствие или концентрация могут отличаться у фертильных и бесплодных пациентов.

Метаболомика [59] — самое последнее дополнение к группе технологий «-омики», которая включает геномику (секвенирование всех генов), транскриптомику (определение всех транскриптов) и протеомику (измерение всех белков). В идеале метабомика стремится измерить все метаболиты, присутствующие в изучаемом биологическом образце. Метаболиты являются небольшими молекулами с молекулярной массой ниже 1200 Да и включают в себя сахара, аминокислоты, ацилкарнитины, органические кислоты и липиды. Все метаболиты вместе в клетке, ткани или организме называются «метаболом» [60]. В отличие от геномного и протеомного, метаболомный анализ имеет ряд преимуществ. Например, геном человека включает в себя порядка 250 000 генов, которые кодируют более 1 миллиона белков. Напротив, метаболом человека содержит около 3000 метаболитов. Данный аспект сказывается не только на скорости, но и на финансово-экономической составляющей исследования. Кроме того, как упоминалось выше,

метабомика, в отличие от протеомики, изучает различные классы молекул [61]. Также стоит отметить, что метабомика наиболее близка к реальному фенотипу по сравнению с другими омиксными методами, так как метаболиты являются конечными продуктами клеточных процессов [62].

Метабомика является междисциплинарной областью науки, которая находится на стыке молекулярной биологии, биохимии и медицины и изучает качественный и количественный состав метаболома единичной клетки или организма, его изменения во времени и под воздействием различных факторов среды [63]. Термин метаболом включает в себя все химические вещества, входящие в состав изучаемого объекта, за исключением белков, поликарбонатов (полисахаридов), нуклеиновых кислот и дает представление о конкретном функциональном и физиологическом состоянии живой системы в определенный момент времени.

Оценка молекулярных составляющих культуральных эмбриологических сред является перспективным направлением для поиска маркеров успешной имплантации эмбриона в полости матки. Отработанные культуральные среды несут в себе параметры о метаболической активности, энергетическом обмене и актуальном состоянии сигнальных систем эмбриона, что позволяет их рассматривать как исключительные объекты для исследования [64].

С развитием технологий, ростом мощностей компьютеров и использованием методов биоинформатики, вычислительной статистики и прикладной математики стало доступным быстрое измерение большего количества метаболитов в малых количествах биологического материала, анализа активности метаболических путей и обратной связи этой активности с фенотипом в совокупности с другими биологическими данными (ферментативной активностью, уровнем экспрессии генов и т. п.) [65].

Изучение метаболического профиля осуществляется при помощи методов спектроскопии, спектрометрии и хроматографии. К данным методам относятся масс-спектрометрия (МС), спектроскопия ядерного магнитного резонанса [66] (ЯМР), масс-спектрометрия с жидкостной хроматографией

(LC), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), рамановская спектроскопии (RAMAN).

Высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС) получила наибольшее распространение в клинической практике для изучения профиля метаболитов. ВЭЖХ-МС позволяет разделять сложные многокомпонентные смеси и детектировать широкий диапазон различных низкомолекулярных соединений. Данный метод требует минимальной пробоподготовки, что обеспечивает высокую производительность анализа [67].

Одним из методов изучения влияния эндометриоза на компетентность ооцитов является анализ ФЖ, представляющей собой активную среду, которая играет решающую роль в росте и созревании ооцитов. В немногочисленных исследованиях сообщалось о различиях в концентрации воспалительных цитокинов [68] и маркеров окислительного стресса [69] в ФЖ у женщин с НГЭ и без него. Эндометриоз также может влиять на метаболические процессы, тем самым изменяя микроокружение фолликула и развитие ооцита. Метаболические отличия, ассоциированные с эндометриозом, были идентифицированы в ФЖ [70] и других биологических жидкостях [71], несмотря на некоторые сообщения, предполагающие обратное [72].

В настоящее время основным механизмом нарушения репродуктивной функции у женщин при НГЭ является местная воспалительная реакция, которая возникает в эндометриоидном очаге, что приводит к местному нарушению клеточного обмена липидов, белков и нуклеиновых кислот, вызывая формирование «токсичной» среды. Такая «токсичная среда» влияет на качество женских гамет, движение сперматозоидов в женском репродуктивном тракте, процесс оплодотворения и развития эмбриона, не только снижая шансы на естественное зачатие, но и оказывая отрицательное влияние на качество эмбрионов и их способность к имплантации при лечении методами ВРТ [73].

В исследовании Vergouw C.G. et al. была изучена связь между показателями метаболомного профиля сред культивирования, полученных методом спектроскопии в ближней инфракрасной области (БИК-спектроскопия), наступлением и прогрессированием беременности при переносе одного эмбриона [74]. В исследование были включены 333 пациентки с последующим селективным переносом одного эмбриона в полость матки на 2–3 сутки развития [74]. Эмбрионы были отобраны по морфологическим показателям и их среды культивирования были исследованы методом БИК-спектроскопии. Авторы выявили уникальные метаболомные профили, связанные с репродуктивным потенциалом эмбрионов. Полученные показатели метаболитов при сравнении между группами с положительными и отрицательными исходами беременности были статистически достоверно различимы ( $p < 0,03$ ) [74]. Методом логистической регрессии была выявлена взаимосвязь между исходами беременности и возрастом матери, процентом фрагментации и жизнеспособностью эмбриона. Степень корреляции определяли по точности вычислений, где точность оценки прогнозирования последующей имплантации жизнеспособных эмбрионов на 3-е сутки по метаболомному профилированию составила 53,6%, а точность морфологического отбора — 38,5% [74]. Кроме того, положительная прогностическая ценность метаболомного анализа была 0,365, а отрицательная — 0,830. Таким образом было показано, что БИК-спектрометрия метаболомного профиля используемых культуральных сред позволяет выбрать эмбрионы с наиболее высокими перспективами к имплантации для переноса в программах ВРТ [74].

На протяжении последних десятилетий в рамках изучения метаболизма углеводов и его влияния на развитие эмбриона в основном исследуется поглощение пирувата, глюкозы, а также выработка лактата. Известно, что лактат и пируват являются ключевыми энергетическими субстратами на стадии делений дробления. При переходе из морулы к стадии бластоцисты эмбрион меняет источник энергопотребления на глюкозу.

В работе Gardner D.K et al. была сделана попытка изучить взаимосвязь между потреблением питательных веществ эмбрионов человека и развитием *in vitro* [75]. Установлена взаимосвязь между потреблением пирувата из культуральной среды и возможностью более успешного развития эмбриона до стадии бластоцисты. В случае остановки эмбриона в развитии на 4-е сутки выявляются значительно более низкие уровни поглощения пирувата и глюкозы, что может служить прогностическим маркером развития эмбриона. Однако не удалось получить убедительных данных о связи этого показателя с имплантацией и исходом беременности. В исследовании Зориной И.М. и соавт. не удалось выявить различий в потреблении глюкозы на 5-й день культивирования у эмбрионов с нормальным и анеуплоидным кариотипом, а также у эмбрионов разного пола [76].

В работе Karaer A. et al. изучали влияние НГЭ на метаболический профиль ФЖ [9]. Образцы ФЖ были собраны у 2 групп (основная — с эндометриозом яичников и контрольная - без эндометриоза) во время проведения трансвагинальной пункции фолликулов яичника. Метаболические составы ФЖ сравнивали с использованием одномерного и многомерного статистического анализа данных ЯМР. Однофакторный и многомерный статистический анализ данных ЯМР показал, что метаболомные профили ФЖ, полученные от женщин с наличием эндометриомы, заметно отличались от таковых, полученных от женщин без эндометриоидных кист яичников. По сравнению с контролем ФЖ женщин с ЭКЯ были выявлены статистически значимые повышенные уровни лактата,  $\beta$ -глюкозы, пирувата и валина. Поскольку глюкоза является основным источником энергии, она является важным метаболитом. Еще в 1993 году Boland N.I. et al. показали, что развитие фолликулов и стероидогенез зависят от концентрации глюкозы и рост фолликулов значительно замедляется при ее низких уровнях [77]. Тогда же было выдвинуто предположение, что фолликулы используют в основном гликолитический способ производства энергии для поддержания роста и стероидогенеза. В 2010 году Sutton-McDowall A. et al. в своем исследовании

показали, что слишком низкие или слишком высокие уровни глюкозы в фолликулярной жидкости негативно сказываются на созревании фолликулов и ооцитов [77]. В проведенном исследовании так же были отмечены повышенные концентрации лактата и пирувата. Авторы предположили, что повышение концентрации лактата у женщин с эндометриозом может объясняться важным анаэробным метаболизмом в цикле овариальной стимуляции, а уровня пирувата — превращением глюкозы в пируват клетками кумулюса [78].

Несмотря на то, что измерение концентрации глюкозы в биологических жидкостях (кровь, моча) является рутинным методом, ее исследование в культуральной среде — весьма трудоемкий метод, требующий высокой точности и чувствительности [79]. Стандартные методики измерения не всегда способны оценить минимальный диапазон колебаний концентрации питательных веществ.

Наряду с углеводным метаболизмом аминокислоты также могут выступать в качестве источника энергии и играть важную роль в раннем эмбриональном развитии. В исследовании Houghton F. et al. было изучено содержание 18 аминокислот на разных этапах развития у эмбрионов человека. Учеными выявлено, что эмбрионы, доросшие до стадии бластоцисты, показали характерный профиль метаболизма аминокислот, отличающийся от тех, которые остановились в развитии.

Seli E. et al. продемонстрировали взаимосвязь между профилем культуральной среды и имплантационным потенциалом эмбриона [80]. В данном исследовании проведен ЯМР-анализ образцов культуральных сред эмбрионов, в результате переноса которых наступила беременность и произошли роды (n=17), и образцы сред (n=17) неимплантировавшихся эмбрионов, отобранных на 3 сутки культивирования. Концентрация глутамата, лактата и аланин лактатат была выше в средах эмбрионов, которые успешно имплантировались в полости матки, что позволило авторам



построить математическую модель прогнозирования исходов программ ВРТ на основании потребления эмбрионами из культуральной среды этих веществ.

В исследовании Edson G.L.T. at al. была предпринята попытка оценить влияние НГЭ на экспрессию белков в ФЖ у пациенток, которым проводилась стимуляция яичников в программах ВРТ [81]. В проведенном проспективном исследовании случай-контроль пациентки в возрасте до 35 лет были разделены на 2 группы: (I группа) женщины с НГЭ III–IV стадии и (II группа) — без эндометриоза. Полученные образцы ФЖ были обработаны с помощью технологии MudPIT (multidimensional protein identification technology). В результате удалось выявить 416 белков или их случайных последовательностей, 64 из которых различались между группами I и II. Для I группы 36 белков (58,1%) были уникальны, и только 1 из белков (1,6%) определялся в более высоких концентрациях, чем во II группе. Для II группы были свои уникальные 17 белков (27,4%) и 8 (12,9%) белков в больших концентрациях, чем в I группе. Авторы предполагают, что именно эти уникальные белки имеют отношение к патофизиологии наружного генитального эндометриоза и могут стать специфическими молекулярными маркерами в случае «скрытого» наружного генитального эндометриоза.

Состав жирных кислот в ФЖ человека также крайне важен для развития ооцитов и развившихся после оплодотворения эмбрионов [82]. В ряде исследований было показано, что липидный состав ФЖ влияет на результат ЭКО [83]. Alaa S. at al. провели липидное исследование и сравнили содержание липидов в ФЖ у пациенток с положительными и отрицательными исходами программ ВРТ [84]. Было выявлено снижение (~2 раза;  $p < 0,001$ ) уровней триацилглицеринов и накопление (10–50%;  $p < 0,001$ ) фосфолипидов и сфинголипидов у женщин с наступившей беременностью. В дополнение к этому сложные эфиры холестерина определялись в более низких концентрациях, тогда как концентрации витамина D были значительно выше в ФЖ при положительном исходе. Cordeiro F.V. at al. проанализировали липидный профиль ФЖ у пациенток с НГЭ и эндометриомой, прошедших

программу ЭКО. Контрольную группу (n=10) составили женщины с трубным или минимальным мужским фактором бесплодия, у которых наступила беременность после ВРТ. Основную группу составили женщины с эндометриозом, диагностированным с помощью видеолапароскопии (n=10), и у тех же пациентов была собрана жидкость эндометриом, в результате чего была сформирована 3-я группа женщин с эндометриомой (n=10). Из ФЖ и эндометриом липиды экстрагировали методом Блая и Дайера, а образцы анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии. В результате в контрольной группе было отмечено более высокое содержание фосфатидилглицеринфосфата, фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидилнозитолбисфосфата. В основной группе преобладали сфинголипиды и фосфатидилхолины, но в группе с ЭКЯ их содержание было значительно выше по сравнению с основной группой. Авторы пришли к выводу, что обнаруженные липиды участвуют в важных механизмах, связанных с прогрессированием эндометриоза [85].

Известно, что плохое качество ооцитов может быть основным фактором неблагоприятных исходов беременности при использовании ВРТ у женщин с эндометриозом. В своей работе Mansour G [86]. et al. показали, что частота оплодотворения снижалась при проведении циклов ЭКО/ИКСИ у мышей с эндометриозом [87]. Разрастание клеток эндометрия матки за пределами ее полости значительно увеличивает потребность в биологической энергии. В исследовании Sun Z. et al. были предприняты попытки выявить различия в метаболитах ФЖ у женщин с эндометриозом [88]. Было проведено исследование случай-контроль, в которое вошли 33 пациентки (основная группа n=17 женщины с бесплодием, обусловленным НГЭ и n=16 – контрольная группа пациенток с мужским фактором бесплодия). В результате были получены три метаболита, включая фитосфингозин, лизофосфатидилхолин (LysoPC) (18:2 (9Z, 12Z)) и LysoPC (18:0), которые были ассоциированы с эндометриозом. В основной группе активность LysoPC (18:2 (9Z, 12Z)) и LysoPC (18:0) была повышена, а фитосфингозина —

понижена. Данные метаболиты участвуют в пролиферации и апоптозе клеток, энергетическом метаболизме, воспалительных реакциях и ангиогенезе. Существуют также работы, в которых показано, что LysoPC активирует акросомную реакцию сперматозоидов [89] (экзоцитоз содержимого акросомы для локального разрушения прозрачной оболочки и преодоления сперматозоидом этого барьера) и об отрицательном влиянии НГЭ на акросому. Из этого следует, что изменения содержания LysoPC в ФЖ может быть одним из факторов снижения частоты оплодотворения у пациенток с эндометриозом за счет нарушения акросомы сперматозоидов [90].

В рамках изучения взаимосвязи липидома с бесплодием, ассоциированным с эндометриозом, Korosh K. at al. [91] предприняли попытки сравнения профиля жирных кислот фосфолипидов в сыворотке крови у пациенток с данной патологией и выявления корреляции этого профиля с НГЭ I–IV ст. В исследование вошли 64 пациентки с НГЭ I–IV ст. (I — 19 женщин, II — 27, III — 8, IV — 10 пациенток) и 74 женщины контрольной группы репродуктивного возраста. После экстракции общих липидов фракцию общих фосфолипидов сыворотки крови выделяли с помощью тонкослойной хроматографии. Состав жирных кислот фосфолипидной фракции определяли с помощью газовой хроматографии и полученный профиль сравнивали у пациенток с НГЭ и контрольной группой.

Аналогичное сравнение проводилось в группе женщин с эндометриозом в зависимости от тяжести заболевания. В результате уровень стеариновой кислоты был значительно ниже в группе с НГЭ по сравнению с контролем ( $p=0,030$ ). В остальном никакие другие составы жирных кислот существенно не различались между основной и контрольной группами. Отношение эйкозапентаеновой кислоты (ЕРА) к арахидоновой кислоте (АА) в сыворотке крови коррелировало с тяжестью эндометриоза ( $r=0,34$ ,  $p=0,006$ ). На основании полученных результатов авторы сделали вывод о том, что уровни жирных кислот в общих фосфолипидах сыворотки, по-видимому, не являются

маркерами эндометриоза, но соотношение ЕРА к АА было важным фактором и коррелировало с тяжестью заболевания.

Margaret M.H. et al. в сходном исследовании стремились определить взаимосвязь между циркулирующими уровнями полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и развитием эндометриоза [92]. Для этого было проведено перекрестное исследование сывороточных ПНЖК и клинических данных 205 женщин программы лечения бесплодия методами ВРТ. ПНЖК в сыворотке измеряли с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и включали n-3 PUFA, такие как  $\alpha$ -линоленовая, эйкозапентаеновая (ЕРА), докозагексаеновая кислоты и n-6 PUFA, такие как линолевая и арахидоновая кислоты. Многовариантная логистическая регрессия использовалась для определения взаимосвязи между конкретными и общими ПНЖК в сыворотке крови и анамнезом женщин с эндометриозом. У женщин с высоким уровнем ЕРА в сыворотке крови вероятность развития эндометриоза была на 82% ниже, чем у женщин с низким уровнем ЕРА (ОШ=0,18, 95% доверительный интервал 0,04–0,78).

ФЖ является биологической средой, которая оказывает прямое воздействие на рост и созревание ооцитов, а в последующем на процесс оплодотворения. Метаболомный профиль сред культивирования отражает возможные функциональные нарушения в развитии эмбриона [92]. Поиск биомаркеров, которые в дальнейшем можно использовать в качестве прогностических факторов развития эмбрионов и исходов ВРТ, является крайне важным направлением [93]. Однако, имеются свои особенности и трудности во внедрении в рутинную клиническую практику анализа метаболитов. К ним относятся различия состава используемых культуральных сред, которые влияют на скорость и характер обменных процессов, отсутствие общепринятой методологии, необходимость использования аналитических инструментов с высокой точностью и чувствительностью для определения незначительных изменений концентрации метаболитов в результате жизнедеятельности единичного эмбриона [94].

В настоящее время внедрение в клиническую медицину методов метаболомного анализа может существенно улучшить понимание процессов нарушения репродуктивной функции на клеточном уровне и дать новые методы оценки имплантационных возможностей эмбрионов. Дальнейшие исследования и оценка молекулярных составляющих питательных сред разных дней культивирования способствуют разработке дополнительных неинвазивных способов выбора эмбриона для селективного переноса, что в последующем позволит создать алгоритм индивидуального ведения женщин в программах ВРТ [95].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Отбор супружеских пар в исследование

Научное исследование проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов для групп сравнения осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия института репродуктивной медицины (заведующий – д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводили в лаборатории молекулярной патофизиологии (заведующий — к.х.н. М.Ю. Бобров).

В соответствии с поставленной целью и задачами в период с 2019 по 2021 гг. было проведено проспективное исследование, в которое после тщательного отбора вошла 121 супружеская пара. Все участники подписали информированное добровольное согласие на участие в данной диссертационной работе. На проведение настоящего исследования было получено разрешение комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

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.

#### **Критерии включения:**

- отсутствие противопоказаний к программе лечения бесплодия методами ВРТ согласно действующим нормативно-правовым актам;
- возраст женщин от 18 до 37 лет;
- нормальный кариотип супругов;
- базальный уровень ФСГ менее 12 мМЕ/мл у женщины;

- АМГ не менее 1,2 нг/мл у женщины;
- субфертильный эякулят (концентрация сперматозоидов более  $20 \times 10^6$ /мл, наличие более 1% морфологически нормальных сперматозоидов по строгим критериям Крюгера, подвижность PR%>25%);
- наружный генитальный эндометриоз I и II стадии распространения, подтвержденный в ходе оперативного вмешательства не позднее 2-х лет до момента вступления в программу ВРТ;
- проведение ПГТ-А;
- оплодотворение методом ИКСИ.

#### **Критерии невключения:**

- противопоказания для проведения лечения методами ВРТ, в том числе экстрагенитальная патология и онкологические заболевания;
- подтвержденный лапароскопически и/или ультрасонографически наружный генитальный эндометриоз III и IV стадии распространения;
- интерстициальная и/или субсерозная миома матки более 4 см, субмукозная миома, деформирующая полость матки;
- патология эндометрия;
- пороки развития половых органов;
- тяжелая патозооспермия;
- аномалии кариотипа и носительство моногенных заболеваний;
- СПКЯ.

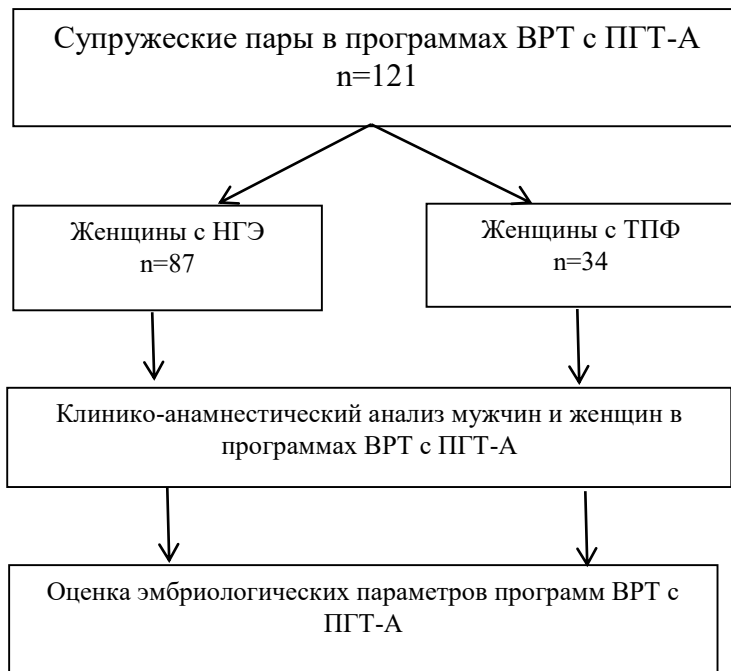
## **2.2. Дизайн исследования**

**Задача 1.** Оценить клинико-anamнестические данные пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.

**Задача 2.** 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.

Было выполнено одномоментное проспективное исследование в параллельных группах. Дизайн представлен на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Дизайн исследования для оценки клинико-anamнестических и эмбриологических параметров в программах ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ и ТПФ

Группы:

- Группа НГЭ — 87 пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах ВРТ с ПГТ-А.
- Группа ТПФ — 34 женщины с трубно-перитонеальным фактором бесплодия в программах ВРТ с ПГТ-А.

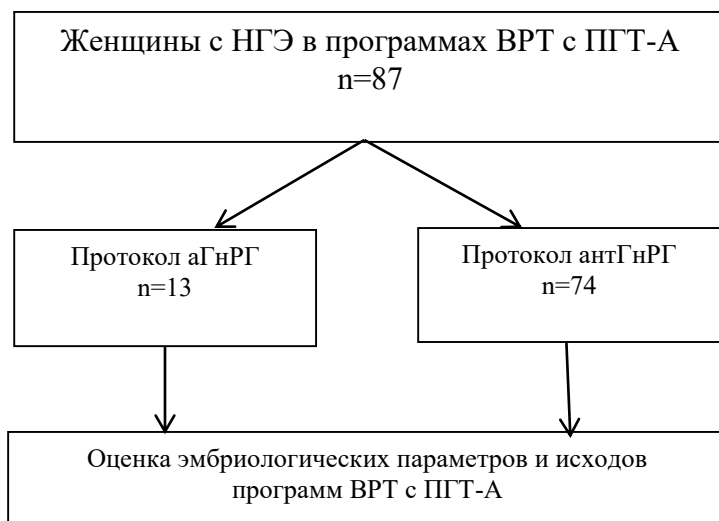
Конечные точки:

- Параметры эмбриологического этапа: частота оплодотворения, частота бластуляции, доля эуплоидных эмбрионов в когорте бластоцист хорошего и отличного качества.
- Относительный риск клинических исходов программ ВРТ с ПГТ-А: частота наступления клинической беременности, частота ранних репродуктивных потерь, частота живорождения.



**Задача 3.** Выявить особенности проведения стимуляции овуляции и подготовки эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения в программах лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А.

Было выполнено ретроспективное исследование согласно дизайну, представленному на рисунках 2 и 3.



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

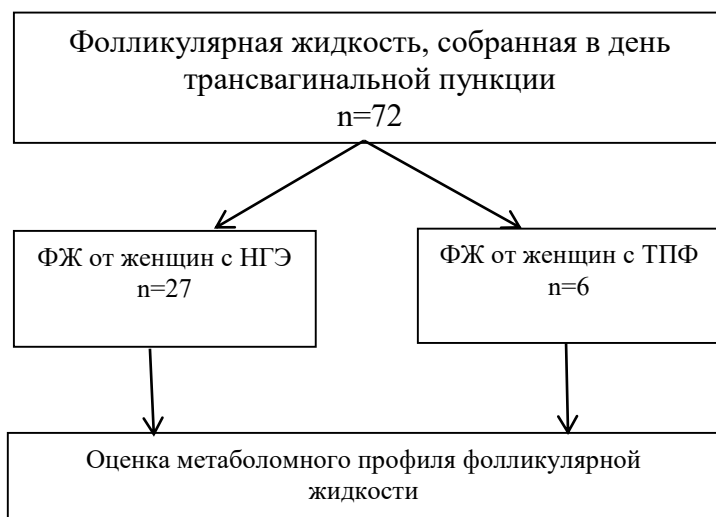


**Рисунок 3.** Дизайн исследования для оценки влияния протокола подготовки эндометрия на исходы программ ВРТ с ПГТ-А у пациенток с НГЭ и ТПФ

Конечные точки:

- Относительный риск исхода: имплантация эмбриона в полости матки.
- Частота ранних репродуктивных потерь, частота живорождения.

**Задача 4.** Проанализировать метаболомный профиль фолликулярной жидкости женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения.



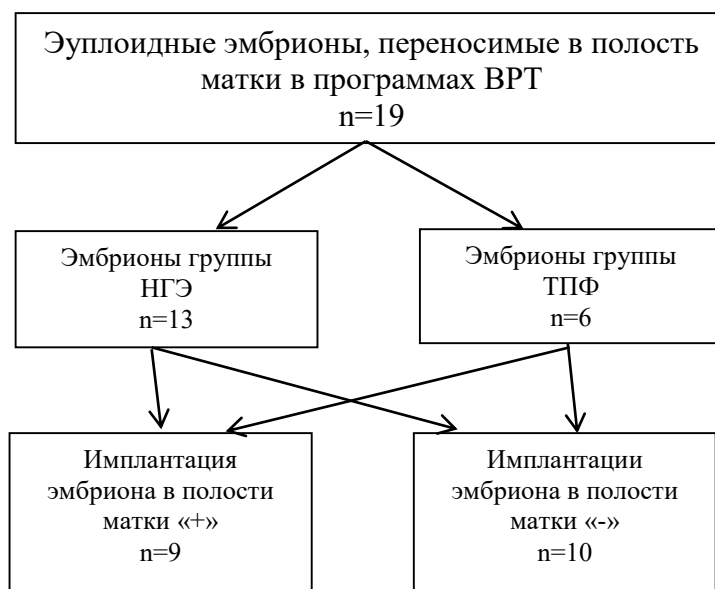
**Рисунок 4.** Дизайн исследования для оценки метаболомного профиля фолликулярной жидкости пациенток с НГЭ и ТПФ

Конечные точки:

- Виды метаболитов.
- Средние и пороговые значения изучаемых маркеров (параметрическая и непараметрическая статистика для сравнения средних показателей, логистическая регрессия для поиска пороговых значений).

**Задача 5.** Провести сравнительный анализ метаболомного профиля отработанных культуральных сред от эуплоидных эмбрионов, полученных от пациенток с НГЭ I и II стадии распространения и женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Были случайным образом отобраны образцы отработанной культуральной среды от эуплоидных эмбрионов анализируемых групп пациенток. Дизайн исследования показан на рисунке 5.



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

Конечные точки:

- Виды метаболитов.
- Средние и пороговые значения изучаемых маркеров (параметрическая и непараметрическая статистика для сравнения средних показателей, логистическая регрессия для поиска пороговых значений).

### **2.3. Обследование супружеских пар перед вступлением в программу лечения бесплодия методами ВРТ**

Полное клинико-лабораторное обследование перед вступлением в программу лечения бесплодия с применением методов ВРТ осуществляли в соответствии с действующим Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н «О порядке использования вспомогательных

репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» от 30 августа 2012 г.

Был произведен тщательный анализ анамнеза всех женщин с целью выявления наследственных заболеваний, аллергических реакций на лекарственные препараты, наличие ранее проведенных оперативных вмешательств, перенесенных хронических или острых соматических и инфекционных заболеваний, которые относятся к группе экстрагенитальной патологии. Особый акцент был сделан на особенностях установки и характере менструального цикла (возраст менархе, регулярность и продолжительность менструального цикла, характер менструации, болезненность и интенсивность кровотечения, наличие «мажущих» выделений до и после менструации) и половой функции (время начала половой жизни, количество половых партнеров и браков, регулярность половой жизни, использованные методы контрацепции), образе жизни, уровне комфортности социально-бытовых и трудовых условий, наличии вредных привычек. Полученные данные об особенностях, клиническом течении и методах лечения ранее перенесенных заболеваний репродуктивной системы так же изучались и подвергались скрупулезному анализу. Данная информация была основана на официальных выписках из медицинской документации, предоставленных пациентами, с обязательным указанием объема выполнения манипуляций и операций, течения послеоперационного периода, наличия или отсутствия осложнений, результатов гистологического исследования. При исследовании уделялось особое внимание репродуктивному анамнезу мужчин и женщин – суммарному количеству беременностей, условиям их наступления (брак и партнер), наличию осложнений во время беременностей, родов и в послеродовом периоде, количеству детей, их физическому и психическому развитию. Собирались информация о длительности и факторах бесплодия пациенток, а также рассматривались способы его лечения, применяемые на ранних этапах, собирались сведения о проведенных программах ВРТ (место и дата процедуры, протокол овариальной стимуляции, количество и качество

полученных ооцитов, метод оплодотворения материала, количество и качество полученных эмбрионов, длительность культивирования и количество перенесенных в матку эмбрионов, количество криоконсервированных эмбрионов, исход программы). Дополнительно уточнялось проведение в ранее проведенных циклах преимплантационного генетического тестирования эмбрионов и проводился анализ результатов исследования. На этапе обследования пациенткам в группах сравнения проводилось измерение длины и массы тела для расчета индекса массы тела (ИМТ) согласно формуле Кетле:  $ИМТ = \text{масса тела} / \text{рост}^2$  (кг/м<sup>2</sup>). Обязательной частью работы была комплексная оценка всех систем организма женщины: дыхательной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, нервной, мочевыделительной и эндокринной, а также опорно-двигательного аппарата в целях выявления ограничений для проведения программы ВРТ. Органы малого таза оценивались по степени развития и наличию анатомических особенностей с помощью осмотра наружных половых органов и бимануального исследования, в ходе которых обращали внимание на размер, форму, подвижность и консистенцию матки, ее болезненность при пальпации, наличие патологических образований в области матки и ее придатков, а также признаки спаечного процесса.

Затем использовали ряд стандартных и специальных методов обследования: 1) определение групповой принадлежности крови и резус-фактора; 2) выявление антител класса IgM, IgG к вирусу иммунодефицита человека 1,2 (ВИЧ 1,2), HBS-антигена, антител к HCV, суммарные антитела к бледной трепонеме в крови у обоих партнеров; 3) общеклинический анализ крови; 4) биохимический анализ крови; 5) коагулограмма; 6) общий анализ мочи; 7) мазок на степень чистоты из влагалища; 8) кольпоскопия и цитологическое исследование биоматериала шейки матки; 9) анализ гормонального профиля на 2–3 день менструального цикла: эстрадиол (E2), фолликулостимулирующий (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), пролактин (ПРЛ), дигидроэпиандростерона сульфат (ДГЭА-С), свободный

тестостерон (Тсв), тиреотропный гормон (ТТГ), кортизол (К), свободный тироксин (Т4св), соматотропный гормон (СТГ), антимюллеров гормон (АМГ); на 20–22 день менструального цикла оценка уровня прогестерона (П); 10) выявление в крови Ig M и Ig G к вирусу краснухи, цитомегаловируса, токсоплазмоза, вирусу простого герпеса I и II типов; 11) оценка инфекционного статуса для выявления заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП) с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР): хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, трихомониаз, вирусы простого герпеса I и II типов, вирус папилломы человека (ВПЧ) 16,18 типов; 12) флюорография легких (при отсутствии результатов за последние 12 месяцев); 13) молекулярно-биологическое исследование на вирус простого герпеса 1, 2, на цитомегаловирус в крови; 14) бактериоскопическое исследование отделяемого влагалища, уретры и цервикального канала с определением титра и чувствительности к антибиотикам; 15) ультразвуковое исследование органов малого таза; 16) регистрация электрокардиограммы; 17) ультразвуковое исследование молочных желез — женщинам до 35 лет, пациенткам старше 35 лет — маммография. Обязательная консультация маммолога при выявлении патологии молочных желез; 18) заключение врача терапевта о состоянии соматического статуса пациентки, отсутствии противопоказаний к проведению овариальной стимуляции, вынашиванию беременности и родам; 19) ультразвуковое исследование щитовидной железы, при выявлении эндокринных нарушений обязательное прохождение консультации врача-эндокринолога; 20) спермограмма супруга или партнера.

*Ультразвуковое исследование органов малого таза*

С целью обнаружения и исключения противопоказаний к вступлению в программу ВРТ на 5–7-й день менструального цикла всем участницам исследования проводилось контрольное ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза на ультразвуковом аппарате компании «Brulle Kierre» (Siemens, Германия) с помощью трансвагинального датчика частотой 7,5 МГц. Важным условием проведения исследования пациенток было наличие

опорожненного мочевого пузыря. Стерильность гарантировалась за счет использования одноразового презерватива. Производилась тщательная оценка размера тела матки, ее формы и положения, структуры миометрия, полости матки, толщины и структуры эндометрия, объема яичников и их расположения, фолликулярного аппарата для оценки овариального резерва. Выявляли наличие или отсутствие объемных образований в малом тазу, степень выраженности спаечного процесса. С началом овариальной стимуляции периодичность проведения УЗ-мониторинга была обусловлена схемой стимуляции функции яичников. Первое контрольное УЗ-исследование органов малого таза проводилось в день начала стимуляции на 2–5 день менструального цикла согласно параметрам овариального резерва. Следующий УЗ-мониторинг динамики фолликулогенеза и роста эндометрия проводили на 5–6 день овариальной стимуляции с целью определения начала введения препарата антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и возможной коррекции дозы вводимого гонадотропина при необходимости, далее — один раз в 2–3 дня для оценки динамики роста фолликулов и эндометрия с целью решения вопроса о назначении триггера финального созревания ооцитов — препарата человеческого хорионического гонадотропина (ХГ).

#### *Исследование эякулята мужчин*

Спермиологическое исследование эякулята назначалось на этапе обследования и в день проведения трансвагинальной пункции яичников (ТВП). До процедуры мужчинам положено было соблюдать список предписанных врачом рекомендаций: режим полового воздержания в течение 3–5 дней, исключение алкогольных напитков и перегреваний (баня, сауна, горячий душ). Забор материала производили в стерильный пластмассовый контейнер. Оценку параметров эякулята производили в соответствии с нормативами ВОЗ от 2010 г. по объему эякулята, консистенции, рН, количеству сперматозоидов в 1 мл и их общему количеству в эякуляте, характеру их подвижности и морфологии сперматозоидов (таблица 1).

Критериями ВОЗ (2010) установлены следующие патологии эякулята: аспермия — отсутствие эякулята; азооспермия — полное отсутствие сперматозоидов в материале; олигозооспермия — концентрация сперматозоидов в эякуляте ниже нормативного значения; тератозооспермия — снижение доли морфологически нормальных сперматозоидов; астенозооспермия — снижение доли подвижных сперматозоидов.

Таблица 1. **Нормативные значения показателей спермограммы (ВОЗ, 2010)**

<b>Показатель</b>	<b>Норматив, единицы измерения</b>
Общий объем эякулята	≥ 1,5 мл
pH	≥7,2
Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	≥15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	≥ 39млн
Время разжижения	10-60 минут
Общая подвижность сперматозоидов	≥40%
Морфология	≥4% нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	≥58% живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	< 1 млн/мл
Агглютинация	Отсутствует
Эритроциты	Отсутствуют
MAR-тест IgG	0–50%

#### **2.4. Протокол стимуляции функции яичников**

К овариальной стимуляции приступали со 2–3 дня менструального цикла. Для овариальной стимуляции функции яичников был выбран протокол с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (антГнРГ). Стартовую дозу гонадотропинов высчитывали индивидуально, учитывая возраст пациентки, параметры овариального резерва и гормональный статус. При динамическом ультразвуковом мониторинге отслеживали рост фолликулов и при необходимости производили коррекцию схемы стимуляции, изменяя дозы вводимых гонадотропинов. После ультразвукового подтверждения лидирующим фолликулом размеров 13–14 мм в диаметре с целью предотвращения преждевременной лютеинизации фолликулов назначали



ежедневное подкожное введение препарата антГнРг в дозе 0,25 мг/сут. Для финального созревания ооцитов по достижении диаметра фолликулов  $\geq 19$  мм назначался человеческий хорионический гонадотропин (ХГЧ) в стандартной дозе 10000 МЕ внутримышечно в качестве триггера овуляции за 36 часов до запланированной трансвагинальной пункции фолликулов.

В настоящем исследовании части женщин был назначен длинный протокол стимуляции функции яичников с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ). Протокол начинался с 21 дня предыдущего менструального цикла с назначением препарата а-ГнРГ - декапептила (диферелина) в дозе 0,1 мг подкожно ежедневно до дня введения ХГЧ. Затем с 3–5-го дня менструации назначали гонадотропины. По достижении диаметра фолликулов  $\geq 19$  мм вводили триггер финального созревания ооцитов — ХГЧ в дозе 10 000 МЕ внутримышечно.

### **2.5. Процедура трансвагинальной пункции фолликулов**

Через 36 часов после введения триггера овуляции под внутривенным обезболиванием и ультразвуковым контролем с использованием одноразовых игл проводили трансвагинальную пункцию фолликулов яичников для забора ооцитов. Аспирацию фолликулярной жидкости осуществляли под отрицательным давлением 140–150 мм водного столба в подогретые заранее стерильные пробирки, которые немедленно передавали эмбриологу для последующей идентификации ооцит-кумулюсного комплекса и оценки степени зрелости полученных ооцитов.

### **2.6. Оплодотворение методом ИКСИ и оценка эмбрионов *in vitro***

Следующим этапом после аспирации фолликулярной жидкости являлась идентификация ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) и промывание их в буфере для гамет от фолликулярной жидкости и крови с дальнейшим помещением каждого из них в персональные стерильные планшеты (Nunc, Дания) в среду для культивирования Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) на 2–3 часа для предварительной инкубации при температуре  $+37,0^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 6%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ . Ооцит-кумулюсные комплексы

подвергали тщательной оценке под стереомикроскопом на подогретой поверхности стерильного ламинарного бокса при сохранении стабильной температуры (+37°C).

Образцы эякулята проходили обработку в градиенте плотности при центрифугировании, отмывали в буфере для гамет (Gametebuffer, COOK, Австралия) и ставили на флотацию. Оплодотворение ооцитов всех участников исследования производилось с использованием метода ИКСИ. Перед непосредственным проведением процедуры ИКСИ после периода предварительной инкубации эмбриологи проводили денудирование ооцитов, а точнее их ферментативное очищение от клеток кумулюса при помощи раствора гиалуронидазы в течение 20 секунд (Irvine Sc., США). После чего ооцит отмывали в среде Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) и помещали обратно в лунки с культуральной средой. Оплодотворение ИКСИ осуществляли стандартным методом. Сразу после окончания оплодотворения ИКСИ ооциты незамедлительно помещали в питательную среду Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., США) для последующего культивирования. Контроль оплодотворения проводили через 17–19 часов после ИКСИ. Оплодотворение считалось нормальным при обнаружении двух пронуклеусов в цитоплазме, при их отсутствии или выявлении одного или более двух пронуклеусов оплодотворение расценивали как аномальное. Оценку качества женских гамет и эмбрионов 5-х суток развития проводили согласно Рекомендациям РАРЧ (2021).

### **2.7. Биопсия бластоцист и преимплантационное генетическое тестирование на анеуплодии**

Биопсию клеток трофобласта проводили на 5-е сутки культивирования после оценки морфологических параметров эмбриона. Далее подготовленный материал направляли в лабораторию молекулярно-генетических методов исследования (руководитель — член-корреспондент РАН, д.б.н. Д.Ю. Трофимов) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ для выявления хромосомных нарушений методом высокопроизводительного секвенирования

нового поколения и методом секвенирования на чипах a-CGH. После проведения процедуры биопсии все полученные эмбрионы витрифицировались средами Kitazato (Япония) согласно инструкциям производителя. Хранение осуществляли в условиях жидкого азота.

Преимплантационное генетическое тестирование на выявление анеуплоидий биологического материала эмбриона проводили с использованием оборудования фирмы Agilent (США). Полногеномную амплификацию ДНК исследуемых клеток проводили, используя набор для проведения WGA-PCR PicoPlex SingleCell WGA Kit (Rubicon Genomics, США) и набор для проведения MDA GenetiSure Pre-Screen Amplification and Labeling Kit (Agilent, США). Качество и количество выделенной в ходе амплификации ДНК контролировали с помощью 1,2% агарозного электрофореза. Мечение ампликонов проводили с помощью набора SureTag DNA labeling Kit Agilent (США), следуя прилагаемой инструкции. Меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 aCGH Agilent (США), гибридизировали 16 часов, а затем проводили отмывку и сканирование на сканере биологических чипов SureScan Microarray Scanner.

Расшифровку и интерпретацию полученных результатов выполняли с помощью программного продукта Agilent CytoGenomics.

## **2.8. Размораживание эуплоидных эмбрионов и перенос в полость матки**

Перенос эмбрионов в полость матки непосредственно в цикле овариальной стимуляции не проводили. Все бластоцисты 5-х и 6-х суток культивирования отличного и хорошего качества криоконсервировали после проведения биопсии клеток трофобласта. Биоптаты передавали лабораторным генетикам для ПГТ-А. Через 2–3 менструальных цикла выполняли перенос криоконсервированных/размороженных эуплоидных эмбрионов. Перенос эмбрионов был выполнен как в естественном овуляторном цикле (ЕЦ), так и в цикле с циклической гормональной терапией (ЦГТ). Выбор схемы криопротокола определялся индивидуально, учитывая данные

фолликулометрии. В овуляторных циклах на 5–7 день происходит селекция фолликула из когорты однородных антральных фолликулов, из которого на 8–12 день менструального цикла созревает доминантный фолликул. При криопротоколе в ЕЦ отслеживается рост доминантного фолликула, на 6-й день после овуляции производится перенос криоконсервированного/размороженного эмбриона.

В криопротоколе в ановуляторных циклах на фоне ЦГТ производилась подготовка эндометрия препаратом эстрадиола валерата с 5–6 дня менструального цикла. Дозу препарата подбирали индивидуально, 4–6 мг/сут – при пероральном приеме, 3 мг/сут – при применении трансдермальной формы препарата.

Поддержку лютеиновой фазы цикла в криопротоколе проводили препаратами прогестерона (микронизированный прогестерон 600 мг/сутки интравагинально или дидрогестерон 30 мг/сутки внутрь).

Бластоцисту размораживали на средах Kitazato (Япония) согласно инструкции производителя. Всем пациенткам был выполнен перенос строго одной эуплоидной бластоцисты.

## **2.9. Диагностика наступления беременности**

Диагностику наступления беременности у пациенток проводили путем контроля концентрации  $\beta$ -субъединицы ХГ в сыворотке крови через 14 дней после переноса криоконсервированного/размороженного эуплоидного эмбриона в полость матки. Через 21 день после переноса эмбриона с целью визуализации плодного яйца проводилось ультразвуковое исследование, а в дальнейшем при сроке 5–6 недель беременности УЗ-мониторинг для определения сердцебиения. Результаты лечения и факт родов были получены путем телефонного опроса всех пациенток с диагностированной беременностью.

## **2.10. Специальные методы исследования**

В ходе исследования были получены образцы фолликулярной жидкости (ФЖ) и сред культивирования эмбрионов различного морфологического

качества от пациенток с эндометриозом и без него, в качестве контрольной группы. Всего было отобрано 72 образца ФЖ и 56 образцов сред культивирования эмбрионов, относящихся к «отличной» и «хорошей» категории (бластоцисты, отвечающие требованиям для переноса в полость матки и криоконсервации) согласно классификации РАРЧ (2021). Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

#### *Сбор фолликулярной жидкости и оценка ее масс-спектрометрического профиля*

ФЖ собирали в день трансвагинальной пункции фолликулов, без примесей крови, из доминантного фолликула в стерильные пробирки (12 мл, BD Falcon, США). После маркировки образцы хранили до момента анализа в условиях морозильника при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Средний объем собранной ФЖ составлял 3,5 мл.

Далее работали по протоколу, указанному в диссертационном исследовании Зориной с соавт. Перед проведением ВЭЖХ-МС проводили экстракцию метаболитов добавлением к 100 мкл фолликулярной жидкости 19 объемов экстракционной смеси метанола, хлороформа и метил-трет-бутилового эфира (в соотношении 4:3:3 по объему) после чего перемешивали 20 мин и центрифугировали ( $13\ 000g$ ) в течение 15 мин. Супернатант переносили в чистые виалы и упаривали под струей азота, после чего сухой остаток растворяли в 45 мкл смеси ацетонитрил: изопропанол (1:1). Для ВЭЖХ-МС анализа к 45 мкл экстракта каждого образца добавляли 5 мкл внутреннего стандарта с конечной концентрацией 5 мкМ, разделение проб проводили на колонке Acquity UPLC BEH HILIC — 1,7 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 1 мм (Waters, USA) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, США).

Элюирование компонентов образцов проводили методом хроматографии гидрофобных взаимодействий в изократическом растворе 5% подвижной фазы «В» (5 мкМ раствор ацетата аммония в воде) и 95% фазы «А»

(100% ацетонитрил) в течение 15 минут, затем в градиенте 5-30% подвижной фазы «В» течение 10 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Затем промывали 5 мин (95 % раствора В), после чего в течение 1 минуты возвращалась исходная концентрация фазы «В» в 5% и колонка 3 мин уравнивалась. Общее время хроматографического анализа одного образца составило 34 минуты. Детекция метаболитов проводилась на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics, Germany) в двух измерениях на один образец. Масс-спектры получали при разрешении 50 000 в диапазоне 100-3000 m/z, в режиме положительно заряженных ионов. Детектирование пиков, их группировка и коррекция времени удерживания проводилась с помощью программного пакета xcms. Детекция пиков была выполнена с помощью алгоритма Centwave с параметрами: разброс m/z – 15ppm; минимальная и максимальная ширина пика – 10 и 50 секунд соответственно. Группировка пиков по всем образцам была выполнена методом Peak Density с параметрами по умолчанию. Для первичной идентификации метаболитов с соответствующими молекулярными массами использовали базу данных HMDB ([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)).

*Анализ параметров потребления компонентов культуральных сред эмбрионами пятых суток культивирования*

Культивирование эмбрионов проводили в индивидуальных каплях культуральных сред (Irvine CSC, США) одинакового объема (30 мкл) под слоем культурального масла (Irvine CSC, США). На 5 сутки культивирования оценивали морфологическое качество полученных эмбрионов с последующим забором в равных объемах (20 мкл) отработанных культуральных сред, которые были промаркированы и заморожены (-80°C).

Определение потребления питательных компонентов из сред культивирования проводили на флуориметре Qubit3.0 (Lifetechnologies) в соответствии с инструкцией производителя коммерческих наборов реактивов Amplex Red Glucose Assay kit и Amplex Red glutamic Acid Assay kit (Molecular Probes Lifetechnologies). Принцип метода основан на сопряжении двух

ферментативных реакций: окисления глюкозы ( $C_6H_{12}O_6$ ) глюкозооксидазой с эквимольным образованием одного из продуктов – перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), которая, в свою очередь, используется ферментом пероксидазой для превращения реагента AmplexRed (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин) во флуоресцирующее производное резорурфин. Соотношение образующегося резорурфина и перекиси равно 1:1. Таким образом, снижение флуоресценции резорурфина соответствует снижению концентрации глюкозы в исследуемом образце.

Перед проведением ВЭЖХ-МС проводили экстракцию метаболитов добавлением трех объемов метанола к одному объему инкубационной среды. После перемешивания преципитат осаждали центрифугированием при 14000g, супернатант использовали для анализа. Для ВЭЖХ-МС анализа отбирали 18 мкл экстракта каждого образца, добавляли 2 мкл внутреннего стандарта с конечной концентрацией 5 мкМ, разделение проб проводили на колонке Atlantis T3 — 3 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 1 мм (Waters, США) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, США).

Элюирование компонентов образцов проводили методом обращенно-фазной хроматографии в изократическом растворе 5% подвижной фазы «В» (0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) и 95% фазы «А» (0,1% раствор муравьиной кислоты в воде) в течение 15 минут, затем в градиенте 5-95% подвижной фазы «В» в течение 10 мин при скорости потока 40 мкл/мин. Затем промывали 5 мин (95 % фазы «В»), после чего в течение 1 минуты возвращалась исходная концентрация фазы «В» в 5% и колонка 3 мин уравнивалась. Общее время хроматографии одного образца составило 34 мин. Детекция метаболитов проводилась на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics, Germany) в двух измерениях на один образец. Масс-спектры получали при разрешении 50 000 в диапазоне 50-1500 m/z, в режиме положительно заряженных ионов. Детектирование пиков, их группировка и коррекция

времени удерживания проводили аналогично методике исследования фолликулярной жидкости. Для первичной идентификации метаболитов также использовали базу данных HMDB.

### **2.11. Статистический анализ полученных данных**

Для анализа статистических параметров был использован индивидуальный компьютер с электронными таблицами «Microsoft Excel» и пакетом прикладных программ «SPSS Statistics 17.0», «Statistica for Windows» v. 7.0. Все собранные количественные данные обработаны с применением метода вариационной статистики. Для всех количественных параметров в базе данных были определены: среднее значение, среднеквадратическое отклонение, ошибка среднего, медиана, 95% доверительный интервал. Для качественных данных вычисляли показатели частоты (%).

На этапе перед проведением сравнительного анализа был определен тип распределения количественных данных для всех групп, входивших в исследование, при помощи критерия Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка, которые определялись в зависимости от размера выборки, а также с использованием построения графиков распределения анализируемых показателей. При нормальном типе распределения данных выявляли среднее значение со стандартным отклонением. С целью сравнения данных применяли методы параметрической статистики: t-тест для анализа параметров в группах сравнения. В случаях, когда количественные данные не подчинялись закону нормального распределения, для их описания применялись медиана и процентиля. Для анализа отличий между группами был использован метод непараметрической статистики: тест Манна-Уитни для сравнения данных в 2-х группах или тест Краскела-Уоллиса для сравнения данных в трех и более группах.

С целью представить качественные данные использовали частоты и доли, с которыми указанные признаки встречались в выборке. Для сравнения качественных параметров и выявления достоверных различий между ними в



2-х и более группах использовали тест  $\chi^2$ , для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности.

Для оценки зависимых переменных использовался коэффициент корреляции. Корреляционный анализ был проведен с применением параметрического критерия Пирсона при нормальном типе распределения данных или непараметрического корреляционного критерия Спирмена при отличном от нормального типа распределения данных.

За достоверно статистически значимые принимались различия при  $p < 0,05$  (95% уровень значимости), при  $p < 0,01$  (99% уровень значимости). Отношение шансов (ОШ) и относительный риск (ОР) представлены с 95% доверительным интервалом (ДИ). Для снижения ошибки выборки использовались строгие критерии отбора исследуемых пациентов. Для уменьшения информационной ошибки исследования применялись одни и те же методы диагностики на базе одной лаборатории. Оценка воздействующего фактора и исхода также была одинакова для всех пациентов.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Клинико-anamнестические характеристики супружеских пар, включенных в исследование

Учитывая поставленные цели и задачи, в исследование была взята 121 супружеская пара, которая обратилась с целью проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ по поводу бесплодия. Все женщины подписали добровольное информированное согласие для проведения работы. Все супружеские пары были разделены на две группы:

- I группа (основная, НГЭ): 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.

Пациенты обеих групп выбраны так, чтобы максимально снизить воздействие вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ. Возраст пациенток был сопоставим в исследуемых группах, не имел статистически значимых различий и составил 32 (30;34) года в группе I и 32 (31;34) — в группе II. Данные представлены в таблице 2. Выявлено, что у всех пациенток, которые приняли участие в исследовании, был нормальный женский тип телосложения с правильным развитием вторичных половых признаков.

Таблица 2. Возрастная характеристика пациенток, включенных в исследование

Исследуемые параметры	Группа I (НГЭ) (n=87)	Группа II (ТПФ) (n=34)	p
Возраст женщин, лет	32 (30;34)	32 (31;34)	0,720

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

При изучении характеристик менструального цикла, параметров овариального резерва, структуры гинекологических заболеваний в анамнезе в представленных группах статистически значимых различий выявлено не было. Характеристика менструальной функции пациенток представлена в таблице 3.

**Таблица 3. Характеристика менструальной функции включенных в исследование женщин**

<b>Показатель</b>	<b>Группа I (НГЭ) (n=87)</b>	<b>Группа II (ТПФ) (n=34)</b>	<b>p</b>
Позднее менархе	10 (11,5%)	5 (14,7)	0,759
Нарушение менструального цикла (полименорея)	0 (0%)	0 (0%)	–
Нарушение менструального цикла (нерегулярный цикл)	8 (9,2)	3 (8,8%)	1,000

*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

Анализ собранных данных о репродуктивном анамнезе у пациенток, вошедших в исследование, показал преобладание случаев вторичного бесплодия у пациенток I группы (52,9%) и первичного — в группе II (55,9%), соответственно. Такие результаты могут быть связаны с патогенезом факторов бесплодия в группах сравнения: оба фактора могут возникнуть в любом репродуктивном возрасте и могут формироваться уже после беременностей и родов в анамнезе у пациентки. Преобладание в группе ТПФ первичного бесплодия может быть связано с возникновением анатомических и функциональных нарушений, которые раньше приводят к необходимости применения методов ВРТ. Данные репродуктивного анамнеза представлены в таблице 4.

Таблица 4. Репродуктивный анамнез пациенток, включенных в исследование

Показатель	Первичное бесплодие	Вторичное бесплодие	p
Группа I (НГЭ) n=87	41 (47,1%)	46 (52,9%)	>0,05
Группа II (ТПФ) n=34	19 (55,9%)	15 (44,1%)	>0,05

Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат

Попытки ЭКО в анамнезе были обнаружены у 48 пациенток (55,2%) из группы I: 33 (68,8%) имели 1 программу, 9 (18,8%) — 2 программы ЭКО, 6 (12,5%) пациентки имели 3 и более программ ЭКО в анамнезе. В группе II у 19 (55,9%) из 34 женщин были программы ЭКО в анамнезе: у 15 (78,9%) – 1, у 1 (5,3%) – 2, у 3 (15,8%) — 3 и более программ соответственно. Из этого следует, что пациентки в I и II группе были сопоставимы по частоте проведенных циклов ЭКО в анамнезе. На рисунке 6 показано распределение пациенток по числу попыток ВРТ в анамнезе в исследуемых группах.

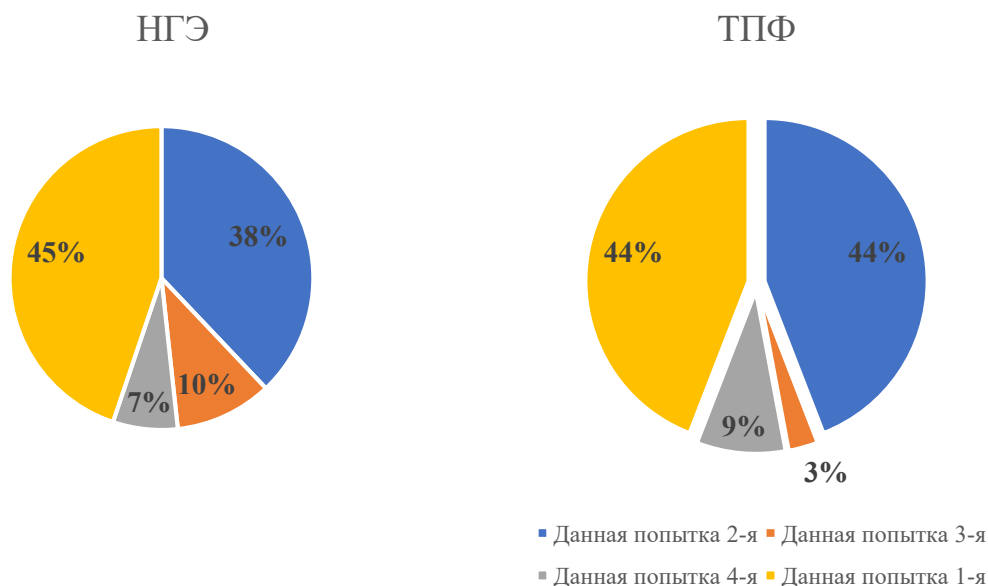


Рисунок 6. Распределение пациенток исследуемых групп по числу предыдущих попыток ВРТ в анамнезе

Данные о частоте и количестве ранее проведенных циклов ВРТ у пациенток, включенных в исследование, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Количество ранее проведенных циклов ВРТ у включенных в исследование пациенток

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	p
Отсутствие циклов ВРТ в анамнезе	39 (44,8%)	15 (44,12%)	>0,05
Циклы ВРТ в анамнезе	48 (55,2%)	19 (55,9%)	>0,05
1 цикл ВРТ	33 (68,8%)	15 (78,9%)	>0,05
2 цикла ВРТ	9 (18,8%)	1 (5,3%)	>0,05
3 и более циклов ВРТ	6 (12,5%)	3 (15,8%)	>0,05

*Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток, Хи-квадрат*

С целью анализа гормонального статуса женщинам на этапе подготовки к программе ВРТ с ПГТ-А проведена оценка гормонального статуса на 2–5 день менструации в одном из менструальных циклов, которые предшествовали циклу проведения программы ЭКО. Исследуемые показатели не подчиняются закону нормального распределения согласно критерию Колмогорова–Смирнова. Анализ представленных уровней гормонов ФСГ, ЛГ и АМГ в крови указывал на наличие у женщин нормального овариального резерва. Уровни ТТГ и Т4 были выше в группе с НГЭ относительно ТПФ, однако не превышали референсных значений. Из этого следует, что функция щитовидной железы была в норме или была скорректирована до начала программы ЭКО. Известно, что гиперпродукция ТТГ у больных с НГЭ при гипофункции щитовидной железы способствует уменьшению уровня ФСГ и повышению продукции пролактина, что приводит к снижению эстрогенпродуцирующей функции яичников. Данные гормонального профиля пациенток представлены в таблице 6.

Таблица 6. Гормональный профиль пациенток, включенных в исследование

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	Норма	p
ФСГ, МЕ/л	6,5 (5,1-7,6)	6,0 (5,1-7,5)	3,0–10,0 МЕ/л	0,663
ЛГ, МЕ/л	5,9 (4,3-7,2)	5,6 (4,6-6,4)	3,0–8,0 МЕ/л	0,436
АМГ, нмоль/мл	3,02 (1,71-5,20)	2,94 (2,25-5,07)	1,0–4,5 нГ/мл	0,429
E <sub>2</sub> , пмоль/л	127,0 (76,2-227,0)	138,0 (77,3-216,3)	150–450 пмоль/л	0,429
Пролактин, мМЕ/л	300,0 (189,5-415,5)	265,0 (159,3-330,3)	120–500 мМЕ/л	0,215
Тестостерон, нмоль/л	1,2 (0,7-2,8)	1,5 (0,7-2,8)	1,0–2,5 нмоль/л	0,741
ТТГ, мМЕ/л	2,2 (1,5-2,9)	1,7 (1,4-2,3)	1,0–3,0 мМЕ/л	0,45
T <sub>4</sub> <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
17-ОН, нмоль/л	1,3 (0,7-2,4)	1,7 (0,8-2,6)	0,3–3,0 нмоль/л	0,33
ДГЭА-С, мкмоль/л	4,1 (2,5-5,2)	3,8 (2,6-5,2)	0,9–11,7 мкмоль/л	0,110
Кортизол, нмоль/л	285,9 (219,7-398,5)	321,0 (224,3-350,8)	200–500 нмоль/л	0,765
СТГ, мМЕ/л	2,8 (1,3-6,0)	1,2 (0,4-2,4)	0,15–13,0 мМЕ/л	0,049

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

Характеристики эякулята на момент вступления в программу лечения бесплодия методами ВРТ у исследуемых групп показаны в таблице 7.

**Таблица 7. Клинико-anamнестические характеристики мужчин в программах ВРТ анализируемых групп**

<b>Показатель</b>	<b>Группа I (НГЭ) n=87</b>	<b>Группа II (ТПФ) n=34</b>	<b>p</b>
Возраст M, лет	33 (31,0; 37,0)	34 (32,0; 37,0)	>0,05
Общая концентрация сперматозоидов, млн/мл	60 (33; 85)	56 (26,3; 82,0)	>0,05
Прогрессивно подвижные сперматозоиды, %	51 (40, 64)	48,5 (38, 69)	>0,05
Морфологически нормальные сперматозоиды, %	3 (2, 3)	2 (1, 2)	>0,05

Таким образом, представленные клинико-anamнестические показатели супружеских пар, включенных в исследование, позволяют проводить сравнение эмбриологических показателей и параметры эффективности лечения, что и было выполнено на следующем этапе.

### **3.2. Характеристика циклов стимуляции функции яичников и параметров раннего эмбриогенеза в программе ВРТ у женщин исследуемых групп**

Каждой участнице исследования были выписаны гонадотропины для овариальной стимуляции функции яичников, средняя продолжительность применения гонадотропинов составляла 9 дней, средняя суммарная доза в группах достоверно не отличалась и составила 1800МЕ в группе НГЭ и 1500 — при ТПФ. Частота использования схем стимуляции функции яичников в программах ВРТ представлена в таблице 8.

У всех пациенток, включенных в исследование, проводили оценку параметров раннего эмбриогенеза (таблица 9). Число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) было достоверно выше в группе ТПФ относительно НГЭ ( $p=0,046$ ). На рисунке 7 показана достоверная тенденция к

увеличению получаемых ооцит-кумулюсных комплексов при тубо-перитонеальном факторе бесплодия в программах ВРТ.

Таблица 8. 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

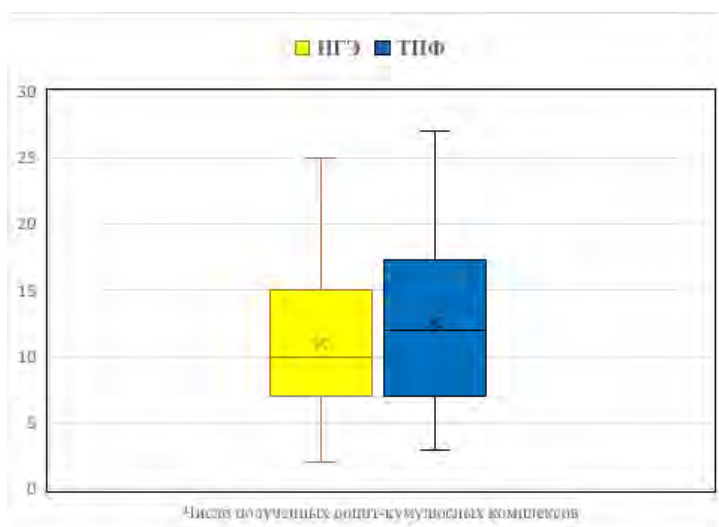


Рисунок 7. Число получаемых при трансвагинальной пункции фолликулов ооцит-кумулюсных комплексов у пациенток исследуемых групп



Доля получаемых зрелых ооцитов на стадии МII и пригодных для дальнейшего оплодотворения не отличалась между группами. Было зафиксированно статистически значимое различие в частоте оплодотворения между пациентками с НГЭ и при ТПФ.

**Таблица 9. Параметры фолликуло- и раннего эмбриогенеза в программе ВРТ с ПГТ-А у пациенток, включенных в исследование**

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	p
Число ОКК	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

Для выяснения причины достоверной разницы в частоте оплодотворения между исследуемыми группами 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). Всего в группе НГЭ было проанализировано 957 ооцитов, в группе ТПФ — 628. Результаты анализа представлены в таблице 10.

Таблица 10. **Морфологические особенности ооцитов, полученных в программе лечения бесплодия методами ВРТ у женщин группы НГЭ и группы сравнения**

Вид дисморфизма ооцита	Группа I (НГЭ) n=957	Группа II (ТПФ) n=628	ОШ, 95% ДИ
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%. Расчитанное 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. На рисунках 8–10 представлены микрофотографии ооцитов пациенток с различными выявленными дисморфизмами.

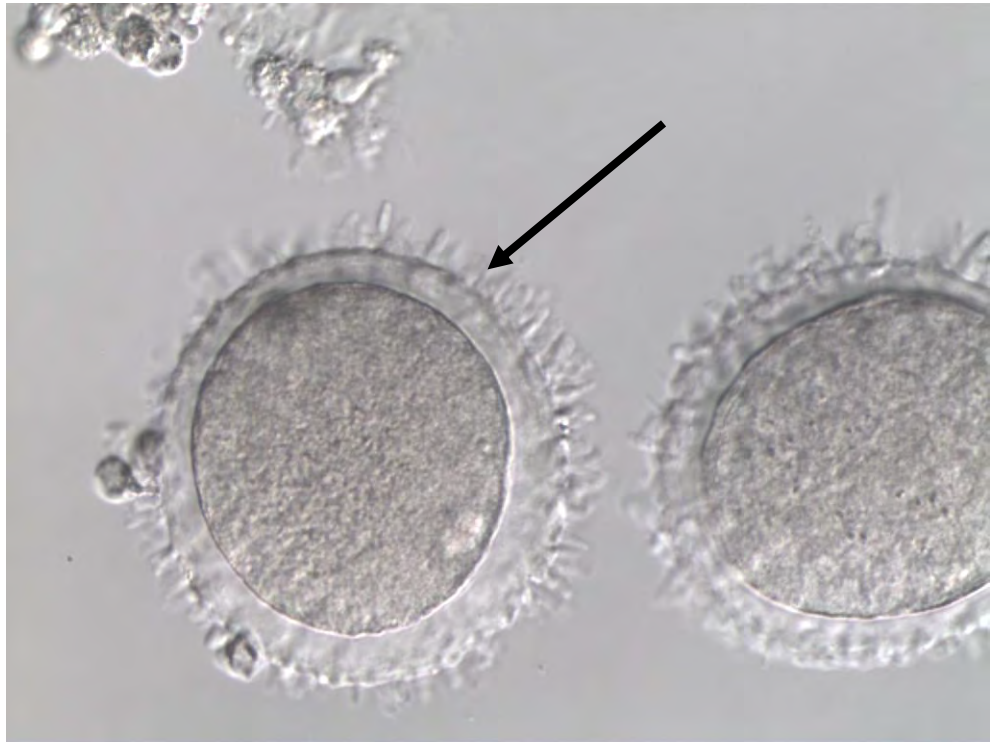
Далее было проведено сравнение морфологических характеристик эмбрионов в исследуемых группах на 5 и 6 сутки культивирования (общее количество бластоцист). По частоте встречаемости в группах было выявлено, что в группе с НГЭ чаще развивались эмбрионы «хорошего» качества на 5 сутки культивирования, по 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 11.



**Рисунок 8.** Процедура оплодотворения методом ИКСИ морфологически нормального зрелого ооцита пациентки с трубно-перитонеальным фактором бесплодия



**Рисунок 9.** Процедура оплодотворения методом ИКСИ ооцита с цитоплазматическими аномалиями (стрелка — гранулярность цитоплазмы, цитоплазматические включения) зрелого ооцита пациентки с наружным генитальным эндометриозом I и II стадией распространения



**Рисунок 10.** Два ооцита с экстрацитоплазматическими аномалиями (стрелка — нарушение строения блестящей оболочки) пациентки с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения

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 10.

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 12.

**Таблица 11. 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 удовлетворительного 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 удовлетворительного 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*

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].

Таблица 12. Процент бластуляции эмбрионов в исследуемых группах

	<b>Группа I (НГЭ) (n=171 эмбрион)</b>	<b>Группа II (ТПФ) (n=62 эмбриона)</b>	<b>p*</b>
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*

Из всего вышеперечисленного 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.

Далее был проведен анализ генетического статуса полученных бластоцист в группах женщин с НГЭ и ТПФ. Результаты представлены в таблице 13. Как видно из таблицы, 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.

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 13. Генетический статус эмбрионов в исследуемых группах по результатам ПГТ-А

Показатель	Группа I (НГЭ) n=87	Группа II (ТПФ) n=34	p
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

### 3.3. Особенности клинического и эмбриологического этапа программ ВРТ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом I - II стадии распространения при разных протоколах стимуляции функции ячников

Ранее считалось, что у женщин с НГЭ целесообразно использование протокола с а-ГнРГ. Однако данные современной научной литературы в этом вопросе носят противоречивый характер, показывая, что нет достоверного преимущества в применении того или иного протокола у пациенток с НГЭ. 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. Полученные результаты представлены в таблице 14. 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.

Таблица 14. 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

### 3.4. Оценка имплантации эмбриона и протоколов подготовки эндометрия у пациенток исследуемых групп

Эффективность 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 15.

**Таблица 15. Исходы программ ВРТ у пациенток в группах сравнения при переносе зуплоидного 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 16. Ни в группе НГЭ, ни при ТПФ не было выявлено достоверных различий между переносом размороженного зуплоидного 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.

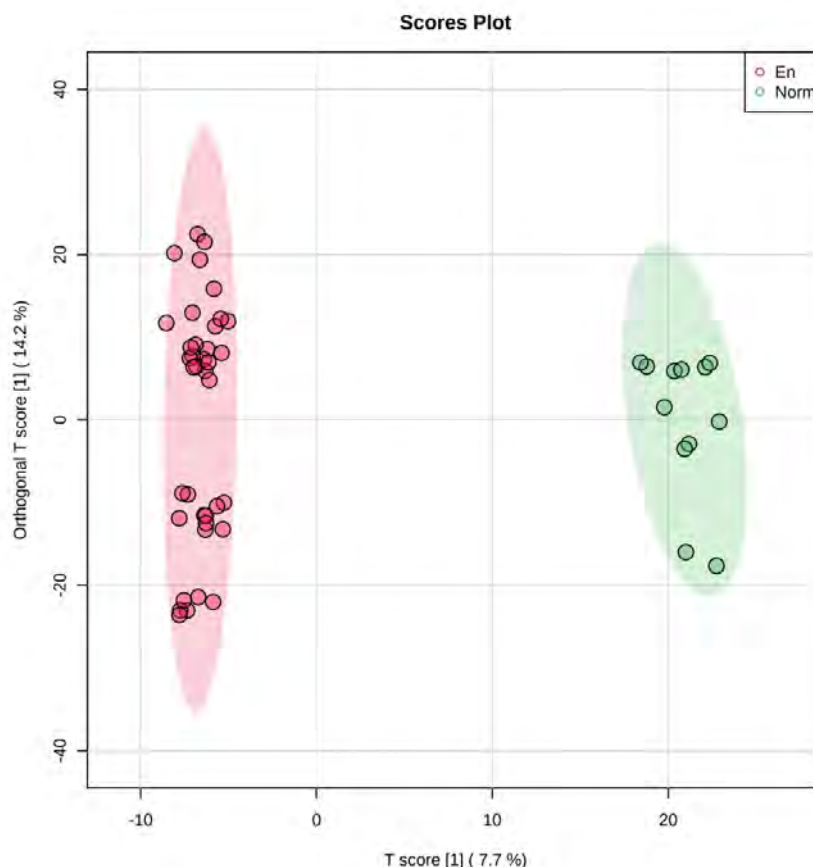
**Таблица 16. Сравнение эффективности протоколов подготовки эндометрия в программах переноса размороженного эуплоидного эмбриона в анализируемых группах женщин**

<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

### 3.5. Особенности метаболомного профиля фолликулярной жидкости пациенток исследуемых групп в программах ВРТ

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-перитонельным 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 11).



**Рисунок 11.** 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. Данные представлены в таблице 17.

**Таблица 17. Список молекулярных ионов, содержание которых статистически значимо изменяется в фолликулярной жидкости пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения по сравнению с контрольной группой**

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение *
149.04913	1.55	3-Amino-2-piperidone	-2.31	M+Cl	0,03
229.06543	5.71	3-Hydroxyphenyl-valeric acid	-4.52	M+Cl	<0,01
246.05578	1.56	3-Methoxytyrosine	-2.09	M+Cl	<0,01
250.12563	2.31	cyclic N-Acetylserotonin glucuronide	2.81	M-H	<0,01
251.09268	2.28	N-a-Acetyl-L-arginine	2.17	M+Cl	0,01
292.9828	6.95	6-Phosphonoglucono-D-lactone	-3.34	M+Cl	0,01
295.0695	9.36	Glutamylhydroxyproline	3.37	M+Cl	0,02
307.00129	6.5	(R)-5-Diphosphomevalonic acid	-2.95	M-H	0,02
397.21644	2.47	19,20-DiHDPA	-5.43	M+Cl	0,01

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение *
421.32544	4.53	Cholesterol	-2.38	M+Cl	0,01
447.30625	2.46	25-Hydroxyvitamin D2	-4.99	M+Cl	<0,01
479.28916	10.43	1- $\alpha$ ,24R,25-Trihydroxyvitamin D2	2.02	M+Cl	0,02
481.27238	10.41	24-Oxo-1 $\alpha$ ,23,25-trihydroxyvitamin D3	2.56	M+Cl	0,01
528.26813	10.28	Cholesta-4,6-dien-3-one	2.09	M-H	<0,01
534.24251	5.04	LysoPE(0:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	4.07	M+Cl	0,02
552.28537	10.23	LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	2.58	M+Cl	0,02
563.50243	4.81	Fahfa(18:1(9z)/8-o-18:0)	-2.73	M-H	0,02
575.45714	4.55	CE(10:0)	-2.57	M+Cl	<0,01
822.58262	3.17	PC(18:0/18:1(11Z))	4.11	M+Cl	0,047
864.55954	8.78	PE-NMe2(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2.28	M-H	<0,01
866.57207	8.79	PE-NMe2(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2.11	M-H	0,01
948.27827	3.29	Lauroyl-CoA	2.54	M-H	0,03

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение *
990.76731	5.33	PC(24:0/24:1(15Z))	3.98	M+Cl	0,01

\*Статистически значимым считался уровень  $p < 0,05$  с учетом коррекции на проверку множественных гипотез (FDR)

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

**Таблица 18. 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.*

Среди выявленных путей преобладают пути, связанные с метаболизмом витаминов, липидов (глицерофосфолипидов и производных докозагексаеновой кислоты – нейропростанов), а также гликанов и гликолипидов (силовые 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.

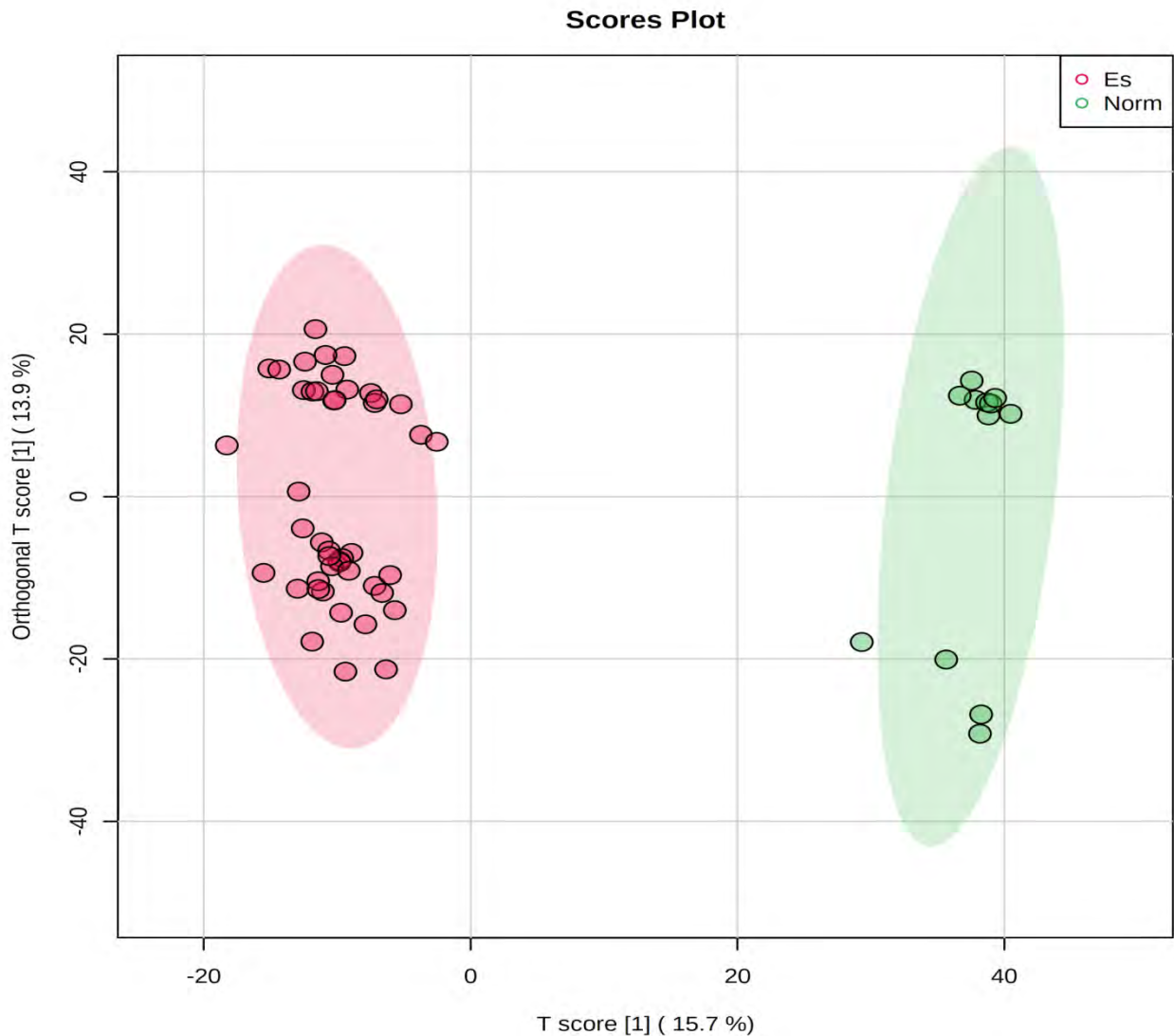
### **3.6. Результаты анализа метаболомного профиля отработанных культуральных сред в программах ВРТ**

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 12. Подобная картина свидетельствует о выраженных отличиях метаболомных профилей сред культивирования исследуемых групп эмбрионов.

Для поиска потенциальных биомаркеров, обуславливающих наблюдаемые различия, были отобраны молекулярные ионы, концентрации

(интегрированные площади соответствующего хроматографического пика) которых между группами статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличались в среднем в 2 и более раз. Всего было отобрано 1213 таких молекулярных ионов. Для идентификации был произведен поиск в базе данных метаболитов человека (HMDB).



**Рисунок 12.** 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. Данные представлены в таблице 19. 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 фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерин, моно-и диглицериды, а также ряд других биологически активных молекул.

**Таблица 19. Список молекулярных ионов, содержание которых изменяется в средах культивирования эмбрионов пациенток с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения**

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение*
160.0734	25.41	-4.8	Tyramine	M+Na	<0,01
160.0977	13.04	4	N-Acetylvaline	M+H	<0,01
183.0881	3.98	5.3	Tryptamine	M+Na	0,02
198.0771	2.36	-8.6	L-Dopa	M+H	<0,01
201.0988	13.03	2.7	2'-Hydroxynicotine	M+Na	<0,01
219.1139	21.08	-7.8	N-Acetylserotonin	M+H	<0,01
297.2019	18.79	2.6	MG(0:0/i-12:0/0:0)	M+Na	0,01
303.2284	25.34	-6.8	Linoleic acid	M+Na	<0,01
311.1997	20.75	-3.8	Dehydroepiandrosterone	M+Na	<0,01
315.2688	28.06	-24	13-HDoHE	M+H	<0,01
327.2318	25.65	2.8	Arachidonic acid	M+Na	<0,01
331.2251	32.84	-6.6	Deoxycorticosterone	M+H	0,01
331.2642	28.54	-47.6	Docosapentaenoic acid (22n-6)	M+H	<0,01
357.2406	24.69	-8.1	14-HDoHE	M+H	<0,01
359.2568	22.8	2.7	Pregnanetriol	M+Na	<0,01

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение*
370.2708	22.34	-5.4	Anandamide	M+Na	<0,01
370.333	28.63	-36.9	N-stearoyl gaba	M+H	<0,01
371.1907	19.37	-3.6	5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone sulfate	M+H	<0,01
379.2596	27.68	4	Tetracosahexanoic acid	M+Na	0,02
415.2827	22.18	-4.8	PE(24:0/24:0)	M+Na	<0,01
441.3334	25.45	-5.6	7 $\alpha$ ,27-Dihydroxycholesterol	M+Na	<0,01
447.3135	22.74	-3.3	24-Oxo-1 $\alpha$ ,23,25-trihydroxyvitamin D3	M+H	<0,01
469.3649	32.12	-28.8	13'-OH-alpha-tocopherol	M+Na	<0,01
483.3454	29.92	-2.4	13'-Carboxy-alpha-tocopherol	M+Na	0,01
564.3089	22.3	-8.7	LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	M+Na	<0,01
643.5329	26.54	-8.2	DG(16:0/0:0/22:5n3)	M+H	<0,01
672.499	27.54	-6.4	PE(14:1(9Z)/P-18:1(11Z))	M+H	<0,01
698.5152	23.52	-17.5	PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/P-16:0)	M+H	<0,01
699.5947	28.45	-11.8	DG(20:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	M+H	<0,01
700.5305	32.29	-49.6	PE(16:1(9Z)/P-18:1(11Z))	M+H	<0,01
702.5053	25.64	-24.6	PC(14:1(9Z)/16:1(9Z))	M+H	<0,01
728.5993	28.4	-20.7	Glucosylceramide (d18:1/18:0)	M+H	<0,01
760.5862	24.98	-2.6	PE-	M+H	<0,01

m/z	Время удерживания	Название	Кратность изменений	Аддукт	FDR p-значение*
			NMe(14:1(9Z)/22:0)		
774.5378	25.49	-5	PE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:0)	M+Na	0,02
778.4654	2.29	-21.8	PS(14:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	M+Na	<0,01
833.6558	28.2	2.4	SM(d18:2(4E,14Z)/24:1(15Z))	M+Na	0,04
920.7057	28.04	2.2	PC(20:1(11Z)/24:1(15Z))	M+Na	0,02

\* Статистически значимым считался уровень  $p < 0,05$  с учетом коррекции на проверку множественных гипотез (FDR). Кратность изменений рассчитана относительно контрольной группы. Идентификация молекулярных ионов проводилась при помощи базы 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 20. 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 20. Список метаболических путей, включающих потенциальные метаболиты, идентифицированные в средах культивирования эмбрионов исследуемых 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.*

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эндометриоз считается одним из самых часто встречающихся заболеваний женской репродуктивной системы. Несмотря на длительность изучения данной проблемы этиология и патогенез эндометриоза остаются до конца невыясненными. Ввиду отсутствия четких патогномоничных симптомов, а также специфических биомаркеров диагностика данного заболевания также затруднена. Известно, что наружный генитальный эндометриоз ассоциирован с различными нарушениями репродуктивной функции женщин, среди которых особое место занимает бесплодие [2]. Патогенез бесплодия, связанного с НГЭ до конца не изучен. К основным причинам относят спаечный процесс в малом тазу, дисфункцию овуляции, нарушения последовательных этапов фолликуло- и оогенеза, негативное влияние на процессы оплодотворения и имплантацию эмбриона. Кроме того, считается, что у пациенток, имеющих эндометриоидные поражения яичников снижается овариальный резерв, а также ответ на гормональную стимуляцию в программах ЭКО [1].

С целью необходимости изучения патогенетических механизмов нарушения репродуктивной функции у женщин с НГЭ и возможной оптимизации тактики ведения таких пациенток в программах лечения бесплодия методами ВРТ, в рамках данного диссертационного исследования был проведен анализ клинико-anamnestических данных женщин с эндометриозом I-II стадии, а также изучен метаболомный профиль фолликулярной жидкости и сред культивирования. Всего была обследована 121 супружеская пара, из которых 87 с НГЭ и 34 — с ТПФ. Пациенты в группах были сопоставимы по возрасту и клинико-anamnestическим данным для снижения воздействия вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ с ПГТ-А. При сравнении групп по вышеописанным критериям статистически значимой разницы выявлено не было.

При изучении репродуктивного анамнеза в группе НГЭ отмечали преобладание случаев вторичного бесплодия (52,9%) и первичного — в группе ТПФ (55,9%). Такие результаты могут быть связаны с патогенезом факторов бесплодия в группах сравнения: оба фактора могут возникнуть в любом репродуктивном возрасте и могут формироваться уже после беременностей и родов в анамнезе у пациентки. Преобладание в группе ТПФ первичного бесплодия может быть связано с возникновением анатомических и функциональных повреждений, которые раньше приводят к необходимости применения ВРТ.

Важным аспектом перед подготовкой к программе лечения бесплодия методами ВРТ является анализ гормонального статуса женщин. Согласно данным научной литературы, имеются клинико-морфологические корреляции, свидетельствующие о том, что эндометриоз является дисгормональным процессом, протекающим в условиях дисбаланса стероидных гормонов. В связи с этим профилактическая и лечебная тактика должна быть направлена на снижение гормональных проявлений у пациентов с данной патологией.

В нашем исследовании оценка гормонального статуса проводилась всем пациентам на 2-5 день менструального цикла, предшествующего овариальной стимуляции. Анализ представленных уровней гормонов ФСГ, ЛГ и АМГ в крови указывал на наличие у женщин нормального овариального резерва. Уровни ТТГ и Т4 были статистически значимо выше в группе с НГЭ относительно ТПФ, однако не превышали референсных значений. Из этого следует, что функция щитовидной железы была в норме или была скоррегирована до начала программы лечения бесплодия методами ВРТ. Известно, что гиперпродукция ТТГ у больных с НГЭ при гипофункции щитовидной железы способствует уменьшению уровня ФСГ и повышению продукции пролактина, что приводит к снижению эстрогенпродуцирующей функции яичников [96]. При недостатке гормонов щитовидной железы происходит нарушение метаболизма эстрогенов на клеточном уровне, что

ведет к гипоестрогенемии. Длительно персистирующая гипоестрогенемия в условиях тканевой гипоксии при субклиническом и клиническом (манифестном) гипотериозе приводит к хронической стимуляции и пролиферации очагов в эндометрии и миометрии. Кроме того, гипофункция щитовидной железы приводит к нарушению периферического метаболизма эстрогенов. При сочетании наружного генитального эндометриоза и гипотиреоза имеет место снижение эстрогенпродуцирующей функции яичников, обусловленной снижением продукции ФСГ, повышением секреции пролактина в аденогипофизе в связи с гиперпродукцией ТТГ. Таким образом, в комплекс лечебных мероприятий пациенткам репродуктивного возраста с НГЭ в сочетании с субклиническим гипотиреозом следует включать заместительную гормональную терапию тиреотропными препаратами.

Ранее считалось, что у женщин с НГЭ целесообразно использование протокола с а-ГнРГ. Однако данные современной научной литературы в этом вопросе носят противоречивый характер, показывая, что нет достоверного преимущества в применении того или иного протокола у пациенток с НГЭ [97]. С целью изучения влияния различных протоколов стимуляции в диссертационной работе были предприняты попытки сравнить эффективность применения протоколов с а-ГнРГ и ант-ГнРГ у женщин из группы НГЭ, оценив эмбриологический этап программ ВРТ. 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 литературными данными. Так в работе Ya Yu et al. была предпринята попытка сравнить лабораторные и клинические результаты ЭКО и переноса эмбрионов у пациенток с эндометриозом с использованием протокола с ант-ГнРГ, длинного протокола с а-ГнРГ или супердлинного протокола с а-ГнРГ. В исследовании принимали участие 313 пациенток с эндометриозом, в том числе 81 пациентка, проходившая лечение в программе ВРТ по протоколу с ант-ГнРГ, у 148 использовался длинный протокол с а-ГнРГ и у 84 пациенток

стимуляция проводилась по супердлинному протоколу с а-ГнРГ [97]. Среднее количество полученных ооцитов, частота оплодотворения и частота бластуляции в группе с препаратами антагонистов был значительно ниже, чем в группе с длинным протоколом ( $p < 0,05$ ), но было сходным с таковым в группе с супердлинным протоколом стимуляции ( $p > 0,05$ ). Частота оплодотворения и частота бластуляции были сопоставимы среди трех групп ( $p > 0,05$ ). При анализе результатов переноса эмбрионов частота положительных результатов по оценке уровня хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), частота наступления беременности и частота имплантации не показали значительных различий между тремя группами ( $p > 0,05$ ). Частота имплантации после переноса эмбрионов в цикле стимуляции в группе с антагонистами была ниже, чем в группе с длинным протоколом ( $p < 0,05$ ), но была сходной с таковой в группе супердлинного протокола ( $p > 0,05$ ). В то время как частота имплантации эмбрионов в криопротоколе была выше в группе с антагонистами, но достоверной разницы в группах сравнения не было ( $p > 0,05$ ). Таким образом, пациентки с эндометриозом, для которых использовали протокол стимуляции с ант-ГнРГ имели сравнимый клинический исход беременности с пациентками в длинном или супердлинном протоколе с а-ГнРГ. Аналогичные результаты были получены и другими авторами. Так и в исследованиях Ercan Bastu at al, Zhou Liang at al. и др. сравнивались результаты лечения бесплодия методами ВРТ при использовании протоколов с а-ГнРГ и ант-ГнРГ у пациенток с эндометриозом [98]. В результате были сделаны выводы, что использование данных протоколов обеспечивают сходные результаты ЭКО у пациенток с эндометриозом.

Учитывая факт индивидуального подбора криопротокола для пациенток в обеих группах (перенос проводился в ЕЦ или на фоне ЦГТ), дополнительно нами была проведена оценка эффективности выбранных протоколов внутри групп сравнения. В группе НГЭ не было выявлено достоверных различий между переносом эмбриона в ЕЦ и на фоне ЦГТ. В группе ТПФ отмечалась



более высокая частота имплантации при переносе в ЕЦ, однако в силу малой численности группы данные были недостоверны. Полученные результаты для группы контроля соответствуют противоречивым данным других исследований, где обсуждается возможное преимущество переноса эмбриона в ЕЦ для пациенток с сохраненной овуляторной функцией и без выраженной гинекологической патологии, к которым можно отнести пациенток с ТПФ. Так в работе Cardenas Armas DF at al. были проанализированы общие результаты переноса эмбрионов в ЕЦ и на фоне ЦГТ. Было проведено ретроспективное когортное исследование с 1265 циклами криопереносов эмбрионов у 860 пациентов. Всего было выполнено 1097 переносов эмбрионов: 163 переноса в ЕЦ и 531 на фоне ЦГТ. При сравнении количества перенесенных эмбрионов, качества и стадии эмбрионов внутри групп не было различий. Однако частота имплантации была значительно выше в ЕЦ при переносе бластоцисты. Что касается частоты наступления беременности, прогрессирующей беременности, живорождения и ранних репродуктивных потерь – между группами не удалось установить достоверных различий, что совпадает с результатами настоящей диссертационной работы. Напротив, коллеги из Китая Zhu S. at al. не обнаружили статистически значимых различий в преимуществе использования ЦГТ или ЕЦ при переносе эмбриона с целью улучшения материнских и неонатальных исходов [144].

Известно, что эндометриоз оказывает пагубное влияние на физиологию яичников. Сонографические и гистологические данные, как правило, подтверждают идею о том, что фолликулы яичников у пациенток с эндометриозом уменьшены в количестве и более атретичны. Кроме того, локальная внутрифолликулярная среда пациентов с НГЭ характеризуется изменениями гранулезно-клеточного компартмента, включая снижение экспрессии ароматазы P450 и увеличение внутриклеточной генерации активных форм кислорода. Однако, до сих пор не проводилось всесторонней оценки данных литературы, посвященных влиянию эндометриоза на качество ооцитов как с клинической, так и с биологической точки зрения. Основываясь

на заключениях систематических обзоров литературы можно сделать вывод, что ооциты, полученные от женщин, страдающих эндометриозом, чаще не созревают *in vitro*, демонстрируют измененную морфологию и более низкое содержание цитоплазматических митохондрий по сравнению с женщинами при других причинах бесплодия [99]. Данные метаанализа, посвященного результатам ВРТ у данной группы женщин, указывают на то, что снижение количества полученных зрелых ооцитов связано непосредственно с наличием эндометриоза, в то время как снижение частоты оплодотворения, скорее всего, варьирует в зависимости от стадии заболевания. Однако доказательства в этой области еще далеки от убедительных. В проведенном нами исследовании были получены аналогичные результаты. Число полученных ОКК статистически значимо преобладало в группе ТПФ относительно НГЭ  $p=0,046$ . Также было показано, что риск появления морфологически аномального ооцита при наличии НГЭ у женщины увеличен до 1,3, что может объяснить достоверное снижение частоты оплодотворения и частоты бластуляции. Всего в диссертации в группе НГЭ было проанализировано 957 ооцитов, в группе ТПФ — 628. Цитоплазматической аномалии женских половых клеток могут быть причиной нарушения формирования пронуклеусов, тем самым снижая частоту оплодотворения у женщин с НГЭ.

На сегодняшний день знаний о качестве ооцитов, которые отражают их морфологические и молекулярные характеристики, недостаточно, ввиду очень ограниченной доступности ооцитов МП для исследований. Однако незрелые ооциты из программ ЭКО, непригодные для оплодотворения, могут быть использованы для изучения морфологических изменений. Современные данные указывают на то, что морфологические характеристики ооцита влияют на процесс хетчинга, имплантации и прогрессирование беременности. Однако влияние каждой стадии морфологических изменений ооцита на его дальнейшее развитие до сих пор не изучено. Было высказано предположение, что наблюдаемые морфологические дефекты, включая зернистость цитоплазмы и/или наличие вакуолей, могут влиять на оплодотворение, однако,

прогностическая ценность этих наблюдений снижена из-за ограничений неинвазивных методов, таких как простая микроскопия в проходящем свете, и проблемы субъективности в морфологических оценках. Более того, на саму морфологию могут влиять и другие факторы, такие как стимуляция яичников или гормональная среда, поэтому ее потенциал в качестве прогностического фактора клинического исхода требует тщательного изучения. Goud et al. провели функциональные исследования, оценивая незрелые ооциты, полученные от женщин с эндометриозом, по сравнению с контролем (женщины без эндометриоза, независимо от их фактора бесплодия). Они обнаружили, что ооциты женщин с эндометриозом демонстрируют повышенную потерю кортикальных гранул и уплотнение блестящей оболочки, что, возможно, препятствует оплодотворению, растворению зоны пеллюцида и способности эмбриона подвергаться вылуплению и имплантации. Кроме того, была оценена способность созревания ооцитов *in vitro* до стадии метафазы II (MII). Было показано, что значительно меньшее количество ооцитов на стадии зародышевого пузырька (GV) и ооцитов метафазы I (MI) способны достичь стадии MII у женщин с НГЭ по сравнению с контрольной группой [100]. Другое ретроспективное исследование также оценивало морфологию ооцитов у пациенток с эндометриозом. Было показано, что дисморфизм ооцитов, известный как темная центральная грануляция в ооплазме, оказался более частым в ооцитах таких пациенток [101].

Особый интерес представляет изучение параметров раннего эмбриогенеза. У всех пациенток, включенных в исследование, проводилась их оценка. 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 группе женщин с НГЭ – 30,4% эмбрионов культивировались до 6 суток, тогда как в ТПФ лишь 12,9%.

Количество зигот, а также число бластоцист достоверно не различалось в сравниваемых группах. Количество эуплоидных эмбрионов в обеих анализируемых группах достоверно не отличалось и было сопоставимо. В группе НГЭ процент пациенток, у которых получились только анеуплоидные эмбрионы (29,9%), был значительно больше, чем в группе ТПФ (14,7%), однако достоверной разницы обнаружить не удалось. По-видимому, отсутствие статистически значимых различий может быть связано с недостаточной выборкой пациентов, вошедших в исследование.

В недавно проведенном исследовании Borges et al наблюдали, что эндометриоз отрицательно коррелировал с потенциалом развития эмбриона, в то время как скорость образования бластоцист оставалась неизменной. Однако, в этом исследовании не было предоставлено никакой информации о качестве бластоцист [102]. Alberto Vaiarelli et al попытались оценить влияние эндометриоза на скорость бластуляции, частоту имплантации и генетическое качество эмбрионов [103]. В ретроспективном многоцентровом исследовании случай-контроль пациенток с НГЭ (n=210) были сопоставлены с контрольной группой. Конечным результатом была средняя частота эуплоидных бластоцист на количество оплодотворенных ооцитов метафазы II. Также оценивались другие эмбриологические, клинические, акушерские и неонатальные исходы. Средняя частота эуплоидных бластоцист на количество оплодотворенных ооцитов метафазы II была одинаковой в двух группах ( $18\% \pm 2,2\%$ ) независимо от возраста матери. Никакой разницы не было показано для всех исследованных эмбриологических параметров. Частота живорождений при переносе одной эуплоидной бластоцисты в криопротоколе также была одинаковой (67/158, 42% у пациенток, страдающих эндометриозом, по сравнению с 132/327, 40% у сопоставимого контроля). Не было отмечено различий в гестационных и неонатальных исходах. Эти результаты полностью совпадают с нашими данными и еще раз убедительно

показывают отсутствие необходимости проведения ПГТ-А у женщин с НГЭ при отсутствии других показаний.

В нашей работе при дальнейшем анализе 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 достоверно чаще развивались эмбрионы «хорошего» качества на 5 сутки культивирования, по сравнению с ТПФ ( $p=0,04$ ). Также в группе с НГЭ на 6 сутки культивирования чаще развивались эмбрионы «удовлетворительного» качества ( $p=0,001$ ). Подобные результаты подтверждают ранее известное предположение о влиянии НГЭ на морфологическое качество эмбрионов [103].

Исходя из вышеперечисленного, полученные результаты нашей работы указывают на то, что тенденция к замедлению бластуляции, возможно, приводит к получению у пациенток с НГЭ эмбрионов с более низким морфологическим качеством в сравнении с группой сравнения.

Оценка эффективности программ ВРТ проводилась по частоте наступления клинической беременности, ранним репродуктивным потерям до 12 недель гестации и частоте живорождения. При сравнении данных параметров между группами не выявлено достоверных различий, однако вновь можно наблюдать выраженные различия в процентных соотношениях показателей эффективности в пользу группы ТПФ. Частота клинической беременности в группе НГЭ составила 40,9%, в ТПФ – 48,2%; ранние репродуктивные потери в группе НГЭ - 16%, ТПФ – 14,2%, а частота живорождения в группе с НГЭ – 84% и 85,7% в группе ТПФ. Все полученные данные не имели статистически значимой разницы. Полученные результаты дали нам повод думать о целесообразности попыток выявить молекулярные факторы, которые приводят к снижению результативности программ лечения бесплодия методами ВРТ у пациенток с НГЭ.

В настоящее время для поиска биомаркеров различных заболеваний активно используют «омиксные» технологии. Метаболомика – это

исследование малых молекул в биологических жидкостях или тканях, которое дает информацию о физиологическом состоянии клеточной ткани или биологической жидкости. Можно использовать различные типы образцов. Среды культивирования эмбрионов различных стадий развития, а также ФЖ, являются уникальными объектами для неинвазивного исследования, так как могут предоставить информацию об энергообмене, метаболической активности и состоянии сигнальных систем эмбриона. Исследование метаболома генерирует большой объем данных, что позволяет получить более достоверные и надежные результаты [104].

В проведенном нами исследовании для изучения особенностей метаболомного профиля были использованы ФЖ, полученные в ходе трансвагинальной пункции яичников и отработанные культуральные среды эуплоидных эмбрионов 5-го дня культивирования, относящихся к группе «отличного» и «хорошего» морфологического качества, от пациенток, проходящих программу лечения бесплодия методами ВРТ с ПГТ-А. Всего в работе были проанализированы 72 образца ФЖ.

В ходе исследования были выявлены достоверные различия профилей метаболитов ФЖ в исследуемых группах пациентов. С использованием баз данных метаболитов человека (HMDB) была произведена первичная идентификация соединений, вносящих вклад в установленные различия между группами [105]. Также был проведен анализ метаболических путей, в которых могут принимать участие потенциальные метаболиты.

По результатам начального масс-спектрометрического исследования было детектировано 3092 молекулярных иона. Для сравнения пациенток групп НГЭ и ТПФ методом многомерной статистики OPLS-DA была показана четкая кластеризация образцов на две области, соответствующие группам сравнения. 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 (3-Hydroxyphenylvaleric acid, Cholesterol, 25-Hydroxyvitamin D2, 1- $\alpha$ ,24R,25-Trihydroxyvitamin D2, 24-Oxo-1 $\alpha$ ,23,25-trihydroxyvitamin D3, Cholesta-4,6-dien-3-one, LysoPE(0:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)), LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0), Fahfa (18:1(9z)/8-o-18:0), CE(10:0), PC(18:0/18:1(11Z)), PE-NMe2(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)), PE-NMe2(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)), Lauroyl-CoA, PC(24:0/24:1(15Z))); производные витаминов (3-Amino-2-piperidone); производные аминокислот (3-Methoxytyrosine, cyclic N-Acetylserotonin glucuronide, N- $\alpha$ -Acetyl-L-arginine, 6-Phosphonoglucono-Glutamylhydroxyproline, (R)-5-Diphosphomevalonic acid, 19,20-DiHDDPA); углеводы (D-lactone)  $p < 0,05$ .

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. Среди выявленных путей преобладали пути, связанные с метаболизмом витаминов, липидов (глицерофосфолипидов и производных докозагексаеновой кислоты – нейростероидов), а также гликанов и гликолипидов (сиаловые кислоты). Из аминокислот статистическую значимость имел только метаболический путь тирозина.

В последующем также представлялось интересным выявление потенциальных биомаркеров. Для этого был проведен одномерный статистический анализ (U-test Манна-Уитни), который выявил 271 молекулярный ион, концентрация которых статистически значимо менялась между группами сравнения в 2 и более раз. Для этих молекулярных ионов также была проведена первичная идентификация с помощью базы данных HMDB. Был получен список молекулярных ионов, содержание которых статистически значимо изменяется в ФЖ у пациенток с НГЭ. Среди них были

выявлены: производные жирных кислот (2-Phenylbutyric acid, MG(18:3), 2,3-Dinor-6-keto-prostaglandin F1a, 7-Dehydrocholesterol, Cholesterol, Oleanol, Oleanolic acid, Penicillanic acid, DG(26:1-O), PC(22:3)-2OH), PE(32:3), PE (32:1), PE(34:4), PE(34:3), PE(36:5), PE(40:7-P- ), PE(36:3), PA(40:3-2OH), PE(40:8), PC(36:2/P-), PG(16:1/PGE2), PS(38:9-OH(18R)), PC(46:4), PC(38:7-OH), PG(40:6)-OH), PA(44:4-2OH/i-), PC(42:7), PC(40:4), PA(TXB2/24:0), PI(18:0/18:1(9Z)-O(12,13)), PI(38:5-2OH)); производные аминокислот (gamma-Glutamylglycine, N-a-Acetyl-L-arginine, 3-(Acetyloxy)-2-hydroxypropyl octadecanoate, Arachidonoylcarnitine, Lutein); производные витамина А (13'-Hydroxy-gamma-tocotrienol); углевод (Calcifediol lactone); тетрапирол (Bilirubin).

Можно видеть, что часть метаболических путей совпадает с задействованными в дифференцировке пациенток с НГЭ и без НГЭ, в частности пути синтеза гормонов, производных липидов, тирозина и др. Однако кроме этих путей в дифференцировке патологии также задействованы пути гликолиза и глюконеогенеза, а также метаболизм витаминов группы В.

Таким образом можно говорить о том, что ФЖ женщин с НГЭ отличается от ФЖ пациенток с ТПФ по наличию большого числа окисленных липидов, что подтверждает теорию о повышенном оксидативном стрессе в тканях при НГЭ. Именно измененный состав липидов в ФЖ может способствовать нарушению процессов оплодотворения у женщин с НГЭ, в дальнейшем приводя к задержке роста эмбрионов на 5-е сутки культивирования, что наблюдали в данной диссертационной работе.

Результаты анализа метаболомного профиля эмбриональных культуральных сред также показали существенные различия в потреблении питательных веществ эмбрионами в зависимости от диагноза матери. 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. Подобная картина



свидетельствует о выраженных отличиях метаболомных профилей сред культивирования исследуемых групп эмбрионов. Для поиска потенциальных биомаркеров, обуславливающих наблюдаемые различия, были отобраны молекулярные ионы, концентрации (интегрированные площади соответствующего хроматографического пика) которых статистически отличались в среднем в 2 и более раз. Всего было отобрано 1213 таких молекулярных ионов. Для идентификации был произведен поиск в базе данных метаболитов человека (HMDB). 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 фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерин, моно-и диглицериды, а также ряд других биологически активных молекул. Список молекулярных ионов, содержание которых изменяется в средах культивирования эмбрионов пациенток с эндометриозом (Tyramine, N-Acetylvaline, Tryptamine, L-Dopa, 2'-Hydroxynicotine, N-Acetylserotonin, MG(0:0/i-12:0/0:0), Linoleic acid, Dehydroepiandrosterone, 13-HDoHE, Arachidonic acid, Deoxycorticosterone, Docosapentaenoic acid (22n-6), 14-HDoHE, Pregnanetriol, Anandamide, N-stearoyl gaba, 5a-Dihydrotestosterone sulfate, Tetracosahexaenoic acid, PE(24:0/24:0), 7-a,27-Dihydroxycholesterol, 24-Oxo-1alpha,23,25-trihydroxyvitamin D3, 13'-OH-alpha-tocopherol, 13'-Carboxy-alpha-tocopherol, LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0), DG(16:0/0:0/22:5n3), PE(14:1(9Z)/P-18:1(11Z)), PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/P-16:0), DG(20:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0), PE(16:1(9Z)/P-18:1(11Z)), PC(14:1(9Z)/16:1(9Z)), Glucosylceramide (d18:1/18:0), PE-NMe(14:1(9Z)/22:0), PE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:0), PS(14:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), SM(d18:2(4E,14Z)/24:1(15Z)), PC(20:1(11Z)/24:1(15Z)))  $p < 0,05$ . 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. В эмбриональных культуральных 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. Список метаболических путей, включающих потенциальные метаболиты, идентифицированные в средах культивирования эмбрионов исследуемых групп:

- $p < 0,05$  (C21-steroid hormone biosynthesis and metabolism, Drug metabolism - cytochrome P450, Methionine and cysteine metabolism);

- $p \geq 0,05$  (Starch and Sucrose Metabolism, Arachidonic acid metabolism, Xenobiotics metabolism, Drug metabolism - other enzymes, Leukotriene metabolism, Tryptophan metabolism, De novo fatty acid biosynthesis, Fatty acid activation, Glycosphingolipid metabolism, Bile acid biosynthesis, Linoleate metabolism, Vitamin E metabolism, Fructose and mannose metabolism, Galactose metabolism, Hexose phosphorylation, Androgen and estrogen biosynthesis and metabolism).

На сегодняшний день предложено более 100 потенциальных биомаркеров эндометриоза, однако ни один из них не показал достаточной диагностической и прогностической ценности. Липидам и жирным кислотам отводится важная роль в обмене веществ организма, так как они являются структурными компонентами, субстратами для энергетического обмена, а также предшественниками различных медиаторов. Липиды и жирные кислоты участвуют практически во всех процессах, происходящих в организме человека. Эти метаболиты являются структурным элементом клеточных мембран, гормонов и вторичных мессенджеров, участвующих в транспорте гидрофобных и амфифильных веществ. В последние годы в научной

литературе встречается все больше исследований, посвященных изменению липидного обмена и метаболизма жирных кислот в ФЖ и средах культивирования у пациенток с НГЭ. Известно, что стероиды это производные холестерина, которые также являются гидрофобными веществами липидной природы. Долгое время считалось, что эстроген является наиболее важным стероидом в патогенезе эндометриоза, однако исследования последних десятилетий, показывают, что снижение чувствительности к прогестерону может играть одинаково важную роль в возникновении и прогрессировании этого заболевания [106]. НГЭ ассоциирован с относительной и абсолютной гиперэстрогенией, а также резистентностью к прогестерону. По данным проведенного нами анализа были обнаружены признаки нарушения стероидогенеза у пациенток с НГЭ.

Считается, что у женщин с эндометриозом преобладают прогестероновые рецепторы типа А, укороченная форма которых действует как ингибитор прогестероновых рецепторов типа В, отвечающих за развитие противовоспалительного действия прогестерона. Первым опубликованным доказательством, поддерживающим концепцию резистентности к прогестерону, было открытие Attia et al., показывающее, что уровни мРНК и белка рецептора PR-B были значительно снижены при наличии очагов эндометриоза, в то время как изоформы PR-A обычно не проявлялись [107]. Впоследствии серия микрочиповых исследований экспрессии генов в эндометрии показала, что гены, регулируемые прогестероном (например, гликоделин, N-ацетилглюкозамин-6-О-сульфотрансфераза, 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа 2 (17 $\beta$  HSD2)), подавляются в тканях, полученных от женщин с эндометриозом по сравнению с пациентками без него [108]. Прогестерон представляет собой природный катаболит холестерина циклопентанопергидрофенантрена. Повышенный уровень холестерина в ФЖ, являющегося предшественником синтеза прогестерона, и снижение в средах культивирования уровней конечных метаболитов обмена прогестерона указывают на дефицит данного гормона [109]. Одним из

побочных эффектов дефицита прогестерона является нарушение регуляции эндоканнабиноидной системы (ECS). ECS состоит из эндоканнабиноидов: анандамида (AEA) и 2-арахидоноилглицерина, их рецепторов и их регуляторных ферментов [110]. В нашем исследовании были выявлены сниженные уровни AEA в средах культивирования эмбрионов пациенток с НГЭ. Эндоканнабиноиды представляют собой эндогенные липиды. Связанные с мембраной каннабиноидные рецепторы (CB1-R и CB2-R) являются членами суперсемейства рецепторов, связанных с G-белком. CB1-R экспрессируется в яичках, плаценте и матке, а также во многих нерепродуктивных тканях. В репродуктивном тракте матка содержит самые высокие концентрации AEA, основного эндогенного лиганда для CB1-R. Снижение уровня прогестерона приводит к потере экспрессии каннабиноидных рецепторов типа 1 (CB1-R) и снижению уровня эндоканнабиноидов. Экспрессия CB1-R в эндометрии обычно увеличивается в секреторной фазе в ответ на прогестерон и модулирует иммунные реакции, необходимые для наступления беременности [111].

В ряде исследований было показано, что половые стероиды влияют на циркулирующие и локальные уровни эндоканнабиноидов, а также на доступность ферментов, необходимых для их синтеза и метаболизма [112]. Moghadam К.К. показал, что прогестерон играет важную роль в регуляции активации и подавлении ряда компонентов ECS. Horne А. опубликовал данные о том, что мРНК CB1-R индуцировалась во время децидуализации изолированных стромальных клеток эндометрия человека в ответ на лечение прогестероном, а временная экспрессия мРНК CB1-R и белка была зарегистрирована в фаллопиевой трубе человека, причем самые высокие уровни ее экспрессии коррелировали в секреторной фазе с преобладанием прогестерона [112]. AEA играет важную роль в фолликулогенезе, созревании преовуляторного фолликула, его созревании и овуляции [113]. El-Talatini M. et al. в своем исследовании при проведении программ ЭКО/ИКСИ выявили, что при успешной имплантации и прогрессировании беременности наблюдались

повышенные уровни АЕА в плазме во время овуляции и его сниженные уровни при имплантации [114]. В работе Bruno M Fonseca изучали взаимосвязь между концентрациями АЕА у женщин в программе ЭКО/ИКСИ, а также оценивали, как различные паттерны воспаления могут запускать продукцию АЕА клетками гранулезы [115]. Медианные концентрации АЕА были ниже у женщин, при мужском факторе бесплодия, чем при эндометриозе (1,6 против 2,5 нМ, соответственно). Результаты данной научной работы показали, что высокие концентрации АЕА у пациенток с эндометриозом могут быть связаны с рекрутированием воспалительных хемокинов в яичниках, которые вместе могут способствовать снижению репродуктивного потенциала женщин с эндометриозом.

Сложные липиды, включающие в свою структуру помимо углерода (С), водорода (Н) и кислорода (О) другие химические элементы, чаще всего фосфор (Р), серу (S), азот (N) являются важными биологически активными сигнальными молекулами, участвующими в разнообразных клеточных процессах. К ним относятся фосфолипиды, гликолипиды (гликосфинголипиды), стероиды и др. АЕА посредством взаимодействия со своими рецепторами может индуцировать гидролиз сфингомиелина с образованием церамида. Церамиды являются предшественниками сфинголипидов, в частности сфингомиелина (церамид-1-фосфохолина), важнейшего представителя группы сфинголипидов. Церамиды принимают участие в механизме апоптоза [116]. Известно, что к повышению выработки церамидов приводят воспалительные процессы и окислительный стресс [117]. Окислительный стресс, вызванный опосредованными воздействиями (цитокинами, ишемией-реперфузией и тд) способствует активации сфингомиелинового цикла, основными компонентами которого являются сфингомиелин, церамид, сфингозин, а также ферменты сфингомиелиназа и церамидаза [118]. Сфингомиелиновый цикл является сигнальной системой, ведущей к деградации сфингомиелина сфингомиелиназой с образованием

церамида, который, в свою очередь, при участии церамидазы превращается в сфингозин, являющийся структурной составляющей гликолипидов.

Гликолипиды также относятся к сложным липидам, которые образуются в результате соединения спиртов, жирных кислот и углеводов. В молекулах гликолипидов есть полярные «головы» (углевод) и неполярные «хвосты» (остатки жирных кислот). Благодаря этому гликолипиды (вместе с фосфолипидами) входят в состав клеточных мембран. Главной формой гликолипидов в животных тканях являются гликоосфинголипиды. Они содержат церамид, а также один или несколько остатков сахаров. Двумя простейшими соединениями этой группы являются галактозилцерамид (GalCer) и глюкозилцерамид (GlcCer). Как было описано выше, церамиды и сфингоидные основания модулируют многие апоптотические сигнальные пути, тогда как их фосфорилирование или гликозилирование может приводить к продукции митогенных факторов, таких как CER-1-фосфат (C1P) и глюкозилцерамид (GlcCer).

В исследовании Lee Y.H. et al. оценивали метаболизм сфинголипидов в перитонеальной жидкости, сыворотке и ткани эндометрия [119]. Сфинголипиды представляют собой особый и очень важный класс липидов, участвующих в различных биологических процессах, являются важными биологически активными сигнальными молекулами. Авторы обнаружили изменения метаболизма сфинголипидов в эктопированном эндометрии, сыворотке крови и перитонеальной жидкости у больных эндометриозом, а также сильную корреляцию с GlcCer у пациенток с эндометриозом, предполагая, что GlcCer является митогенным фактором в развитии эндометриоидного очага. Из полученных данных можно предположить, что измененный метаболизм сфинголипидов, наблюдаемый в сыворотке, перитонеальной жидкости и ткани эндометрия у женщин с НГЭ, может являться потенциальным биомаркером в диагностике эндометриоза [120].

Существуют исследования, в которых предпринимались попытки идентифицировать эндометриоз с использованием липидов в качестве

биомаркеров заболевания. Например, Vouk K. et al. изучали сыворотку крови пациентов с эндометриозом, используя метод масс-спектрометрии, и описали восемь дифференциальных липидных метаболитов [121]. Среди них были гидроксисфингомиелины SMOH C16:1 и SMOH C22:2, сфингомиелин SMC16:1 и пять эфирфосфолипидов (ацил-алкилфосфатидилхолины), а также два насыщенных 2-ацил-1-алкил-sn-глицеро-3-фосфохолины (плазманилхолины). Авторы разработали модель, выявляющую эндометриоз, с использованием нескольких липидов с чувствительностью 90,0% и специфичностью 84,3%. В работе Dutta et al. были подтверждены данные о более высокой концентрации фосфатидилхолинов в образцах сыворотки у пациенток с НГЭ [122]. В исследовании Адамян Л.В. были предприняты попытки показать, что прямая масс-спектрометрия может играть важную роль в идентификации эндометриоидной ткани [123]. Были идентифицированы липиды трех важных классов: сфинголипиды, фосфолипиды и жирные кислоты (ди- и триглицериды). Из 148 метаболитов 15 продемонстрировали значительные различия между эндометриоидной тканью и здоровым эндометрием той же пациентки, рассматриваемой в этом исследовании в качестве контроля. Основными липидами, преобладающими в эндометриоидных тканях, были фосфоэтанолламин (ФЭ О-20:0), сфингомиелин (СМ 34:1), диглицериды (ДГ 44:9), фосфатидилхолины (ФХ 32:1, ФХ О-36:3, ФХ 38):7, ПК 38:6, ПК 40:8, ПК 40:7, ПК 40:6, ПК 40:9 и ПК О-42:1), а также триглицериды (ТГ 41:2, ТГ 49:4, и ТГ 52:3). Используя модели частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов, было показано, что липидный профиль эндометриоидной ткани (перитонеальный эндометриоз и эндометриомы яичников) четко отделен от эутопического эндометрия, что указывает на дифференцировку по типу ткани.

Известно, что аномальный метаболизм фосфатидилхолина существует при многих заболеваниях, включая эндометриоз [123]. Фосфоэтанолламин является субстратом для многочисленных фосфолипидов мембранных клеток, прежде всего фосфатидилхолина. Это может объяснить наличие

фосфоэтаноламина в тканях эндометрия, поскольку он является предшественником фосфатидилхолина. Фосфоэтаноламин является наиболее распространенным липидом на цитоплазматической мембране, который участвует в различных клеточных активностях, т. е. в клеточном цикле, слиянии мембран, аутофагии и апоптозе [124].

Таким образом, полученные нами результаты, которые согласуются с многочисленными аналогичными научными работами, указывают на то, что сложные липиды, связанные с подавлением апоптоза, окислительным стрессом и пролиферацией клеток, могут являться потенциальными маркерами развития эндометриоза [125].

Простые липиды, к которым относятся жирные кислоты, имеют также немаловажное значение в развитии НГЭ. В ряде исследований было показано, что нарушения в обмене омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), а также их окисленных производных (оксилипинов) могут быть одним из патогенетических факторов развития заболевания [126]. Так в работе Норетан М.М. et al. было установлено, что в плазме крови пациенток с НГЭ, прошедших лечение в рамках программ ЭКО/ИКСИ, был снижен уровень эйкозапентаеновой кислоты (омега-3), которая является субстратом для синтеза оксилипинов с низкой воспалительной активностью. Снижение уровня эйкозапентаеновой кислоты и других омега-3 ПНЖК может приводить к увеличению продукции оксилипинов из омега-6 ПНЖК, которые обладают выраженным воспалительным действием. Было показано, что при эндометриозе наблюдается повышенная продукция окисленного производного арахидоновой кислоты (омега-6) простагландина E<sub>2</sub>, являющегося одним из ключевых факторов в развитии воспалительных реакций [127]. В средах культивирования, полученных от пациенток с НГЭ, было зафиксировано повышение уровня арахидоновой кислоты, а также снижение уровня докозапентаеновой кислоты (омега-3) и окисленных производных декозагексаеновой кислоты (омега-3), что может свидетельствовать о нарушении баланса продукции медиаторов липидной



природы. Различные оксипирины, помимо участия в воспалительных реакциях, обеспечивают аутокринную и паракринную регуляцию процессов жизнедеятельности клеток. Изменения баланса продукции оксипиринов эмбрионами может приводить к нарушению процессов межклеточных коммуникаций и снижению имплантационного потенциала.

Метаболизм бутирата (метаболизм бутаноата) описывает метаболическую судьбу ряда короткоцепочечных жирных кислот или короткоцепочечных спиртов, которые обычно образуются в результате кишечной ферментации. Многие из этих молекул в конечном итоге используются для производства кетоновых тел, создания короткоцепочечных липидов или в качестве предшественников цитратного цикла, гликолиза или синтеза глутамата. Молекула, в честь которой назван этот путь, масляная кислота, представляет собой четырехуглеродную жирную кислоту, которая образуется в толстой кишке человека в результате бактериальной ферментации углеводов (включая пищевые волокна) [128]. Одним из механизмов, с помощью которого кишечные бактерии млекопитающих влияют на физиологию хозяина и иммунологические процессы, является переработка неперевариваемых питательных веществ в биологически активные метаболиты, включая короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК). КЦЖК в первую очередь воздействуют на клетки посредством двух ключевых механизмов. Во-первых, они могут активировать связанные с G-белком рецепторы GPR43, GPR41 и GPR109A, которые, как известно, подавляют воспаление. Во-вторых, они могут ингибировать деацетилазы гистонов [129]. КЦЖК, такие как ацетат, пропионат, н-бутират, пентановая (валериановая) и гексановая (капроновая) кислоты, используются энтероцитами в качестве источника энергии или транспортируются в кровотоки, где они могут оказывать антипролиферативное и противовоспалительное действие на отдаленные органы.

Н-бутират подавляет пролиферацию молочной железы человека и колоректальные раковые клетки. Н-бутират оказывает

противовоспалительное действие как на макрофаги собственной пластинки толстой кишки, так и на макрофаги, происходящие из костного мозга. Кроме того, н-бутират ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и IL-6 в липополисахарид-индуцированных макрофагах [130].

В проведенном исследовании Chadchan S.B. et al. [131]. Авторы использовали инъекционную модель эндометриоза у мышей, чтобы проверить гипотезу о том, что КЦЖК, полученные из кишечной микробиоты, влияют на прогрессирование эндометриоза. Было выяснено, что мыши с эндометриозом имеют меньше н-бутирата в кале, чем мыши без него, и что введение н-бутирата может уменьшить рост эндометриозных поражений. Авторы показали, что н-бутират действует через рецепторы, связанные с G-белком (GPR), гистоновые деацетилазы и RAR1GAP, ингибируя рост эндометриозных поражений, и, что интересно, н-бутират регулирует RAR1GAP, возможно, посредством ингибирования HDAC1. Было показано, что н-бутират снижает уровень активного RAR1 в эндометриозных эпителиальных клетках и ингибирует рост эндометриозных клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo* в доклинической экспериментальной модели.

Немало работ посвящено исследованию роли аминокислот в ткани эндометрия в сыворотке, фолликулярной жидкости и моче у женщин с эндометриозом [132]. Например, в работах Dutta et al. (2012, 2018) было выявлено повышение уровня лейцина в сыворотке крови у пациентов с эндометриозом, в то время как Jana et al. (2013) продемонстрировали снижение его уровня [133]. Dutta et al. отбирали образцы у женщин во время их секреторной фазы, тогда как Jana et al. собирали образцы во время фолликулярной фазы. Можно предположить, что метаболом, являясь динамичной системой, подвержен влиянию различных факторов, ввиду чего изменение гормонального фона в различные фазы менструального цикла отражается на уровне аминокислот.

В нашем исследовании были получены статистически значимые различия в метаболических путях тирозина, метионина, цистеина и триптофана, что также согласуется с данными научной литературы. Измененные уровни аминокислот потенциально объясняют механизмы восстановления тканей при эндометриозе и повышенную потребность в энергии пролиферативных клеток эндометрия. По мнению Dutta et al. (2018) «катаболическое состояние, индуцированное в ответ на повреждение при эндометриозе, приводит к повышенному распаду эндогенного белка и высвобождению свободных аминокислот в кровотоке». Многие сходства клеток эндометрия с опухолевыми клетками такие, как высокая способность к пролиферации, ангиогенезу, антиапоптозу и клеточной инвазии, широко известны в литературе. Все эти характеристики требуют высокого катаболического состояния, при котором аминокислоты могут служить важным источником для образования промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот и поддерживать энергетические потребности быстрорастущих клеток эндометрия [134].

Важным фактором, влияющим на качество гамет у супружеских пар с бесплодием, является окислительный стресс, развивающийся на фоне недостаточной активности систем антиоксидантной защиты. Избыточная продукция активных форм кислорода также может оказывать токсическое действие на эмбрион, что может приводить к нарушениям развития и снижению способности к имплантации. Согласно современным представлениям, окислительный стресс является одним из ключевых факторов в патогенезе эндометриоза [1]. Дисбаланс в продукции активных форм кислорода стимулирует пролиферацию клеток эндометриодных гетеротопий и формирование вокруг них провоспалительного окружения, что может быть одним из факторов снижения фертильности у больных эндометриозом уже при начальных стадиях заболевания.

В проведенном нами исследовании среди выявленных метаболических путей, в которые вовлечены компоненты, обуславливающие различия между

группами, статистически значимо различался метаболический путь тирозина. Некоторыми авторами отмечается важность метаболического пути тирозина при эндометриозе [135]. Тирозин ( $\alpha$ -амино- $\beta$ -(*p*-гидроксифенил) пропионовая кислота) – ароматическая альфа-аминокислота. Существует в двух оптически изомерных формах — L и D и в виде рацемата (DL). По строению соединение отличается от фенилаланина наличием фенольной гидроксильной группы в паразоложении бензольного кольца. Превращение фенилаланина в тирозин в организме в большей степени необходимо для удаления избытка фенилаланина, а не для восстановления запасов тирозина. Тирозин путём переаминирования с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой превращается в 4-гидроксифенилпируват, который далее окисляется (с одновременной миграцией и декарбоксилированием кетокарбоксиэтильного заместителя) в гомогентизат. Гомогентизат через стадии образования 4-малеилацетоацетата и 4-фумарилацетоацетата распадается до фумарата и ацетоацетата. Окончательное разрушение происходит в цикле Кребса. Таким образом, у животных и человека тирозин распадается до фумарата (превращается в оксалоацетат, являющийся субстратом глюконеогенеза) и ацетоацетата (повышает уровень кетоновых тел в крови), поэтому тирозин, а также превращающийся в него фенилаланин, по характеру катаболизма у животных относят к глюко-кетогенным (смешанным) аминокислотам.

В работе Rocate-Cheriet K. et al. были выявлены более низкие концентрации таких аминокислот, как тирозин и аланин при наличии эндометриоза [136]. При этом концентрация кетоновых тел и свободных жирных кислот (СЖК) была выше в фолликулярной жидкости женщин с НГЭ. В исследовании Jingjie Li также была предпринята попытка оценить метаболический профиль пациенток с эндометриозом и выявить потенциальные биомаркеры для диагностики данного заболевания на ранних стадиях [137]. Вариации метаболического профиля эутопического эндометрия оценивали с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения с ионизацией

электрораспылением (UHPLC-ESI-HRMS). В данном исследовании метаболический профиль эутопического эндометрия у больных эндометриозом, напротив, характеризовался достоверным повышением концентрации L-тирозина. Кроме того, было выявлено повышение концентрации гипоксантина, L-аргинина, лейцина, лизина, инозина, омега-3 арахидоновой кислоты, гуанозина, ксантозина, лизофосфатидилэтаноламина и аспарагина. Авторы сделали вывод, что метаболизм пуринов и аминокислот в патофизиологии эндометриоза имеет важное значение, а выявленные метаболиты являются потенциальными биомаркерами для полуинвазивной диагностики эндометриоза на ранней стадии.

Такие противоречивые данные можно объяснить различными метаболическими путями, в которые вовлечен тирозин. С одной стороны, уровень тирозина понижается, что объясняется геознергетическим состоянием, ввиду недостатка глюкозы и активации процесса глюконеогенеза. С другой стороны, в некоторых ситуациях наблюдается повышение уровня данной аминокислоты, что, вероятно, связано с ее вовлечением в процессы анаболизма. Выявленный нами метаболический путь тирозина может свидетельствовать о вероятном переключении метаболических путей с процессов катаболизма на анаболизм и наоборот.

В нашем исследовании обнаруженные пути гликолиза и глюконеогенеза в группе с эндометриозом также имеют важное значение в патогенезе данного заболевания. Гликолиз и глюконеогенез являются взаимосвязанными процессами энергетического обмена. В ряде исследований подчеркивается важность энергетических путей в характеристике фолликулярной жидкости пациенток с НГЭ. Отмечается, что в образцах фолликулярной жидкости пациентов с этой патологией было обнаружено снижение концентрации глюкозы, тогда как концентрации лактата и пирувата были повышены. Эти три метаболита связаны с гликолизом, который, как было показано, обеспечивает энергию для роста ооцитов [138]. Этот путь более активен у пациенток с НГЭ. Эндометриоидные клетки характеризуются более высокими потребностями в

энергии и проявляют свойства, сравнимые со свойствами раковых клеток. Таким образом, повышенный уровень гликолиза может быть результатом хорошо известного эффекта Варбурга (Warburg, 1956), что способствует быстрой пролиферации клеток.

Усиление гликолиза также может быть связано с увеличением активности гранулезных клеток в ответ на повышенную потребность в энергии, в среде с довольно низким содержанием кислорода у пациенток с эндометриозом. С другой стороны, накопление лактата и пирувата может также отражать дисфункцию клеточного дыхания в митохондриях эндометриоидной ткани [139]. Это подтверждается наблюдением более высоких концентраций треонина в образцах фолликулярной жидкости женщин с НГЭ [140].

Снижение активности митохондриального дыхания при эндометриозе потенциально может быть связано с гипоксическими состояниями, наблюдаемыми в начальный период развития эндометриоза или с дефектом митохондрий. Окислительный стресс также может оказывать негативное воздействие на функцию митохондрий, в то время как активные формы кислорода могут оказывать отрицательное влияние на цикл трикарбоновых кислот. Поскольку эндометриоз связан с окислительным стрессом, который также влияет на состав фолликулярной жидкости, метаболический переход на анаэробный гликолиз может быть связан с усилением окислительного стресса. Сообщается, что более высокая концентрация кетоновых тел и свободных жирных кислот (СЖК) также наблюдается у пациенток с НГЭ [136]. Основным путем образования кетоновых тел, опосредованный действием липаз, активируется, когда концентрация глюкозы недостаточна для удовлетворения энергетических потребностей клеток. Кетоновые тела являются конечными продуктами метаболизма липидов посредством их деградации до свободных жирных кислот с последующим бета-окислением, ведущим к продукции ацетил-КоА, который является одним из субстратов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) [141]. Если количество ацетил-КоА слишком велико или если

ЦТК нарушен, ацетил-КоА направляется на образование кетоновых тел. Превращение тирозина в ацетоацетат может также способствовать образованию кетоновых тел, что согласуется с более низкой концентрацией тирозина, наблюдаемой в образцах фолликулярной жидкости у пациентов с НГЭ. Однако в норме кетоновые тела в основном продуцируются в митохондриях клеток печени и некоторых других клетках [142]. Maignien et al. в недавно проведенном исследовании сообщили, что в сыворотке пациенток с эндометриозом отмечаются более высокие концентрации кетоновых тел [143]. Возможно, что увеличение концентрации кетоновых тел при эндометриозе, соответствует воспалительному и окислительному характеру этого заболевания.

Окислительный стресс, характеризующийся дисбалансом между активными формами кислорода (АФК) и биологическими антиоксидантами, может играть ключевую роль в патофизиологии эндометриоза [145]. Молекулы АФК могут активировать механизмы клеточного апоптоза, приводящие к гибели клеток. Все больше данных указывает на то, что женщины с эндометриозом имеют более высокие уровни малонового диальдегида и АФК и более низкую общую антиоксидантную способность по сравнению с условно здоровыми женщинами. В своем исследовании Halpern G. et al. обсуждают значение дефицита антиоксидантов на прогрессирование эндометриоза [145]. Повышение уровня антиоксидантов может способствовать снижению развития эндометриоза, связанного с окислительным повреждением. К важным компонентам антиоксидантной системы относят, в частности, витамин Е, индольные производные и витамин D, которые способны оказывать противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Витамины группы D снижают синтез провоспалительных оксипинов, подавляя экспрессию циклооксигеназы-2. В проведенном нами исследовании были выявлены изменения метаболитов витаминов А, В, D и Е в ФЖ и средах культивирования эмбрионов в группе НГЭ. Как было указано выше причиной развития эндометриоза может быть

снижение содержания в сыворотке крови ряда витаминов, являющихся компонентами антиоксидантной системы. Изменение в выявленных метаболических путях витаминов может быть связано с их пониженным уровнем у пациенток с эндометриозом.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования были показаны изменения в метаболоме ФЖ и сред культивирования эмбрионов пациенток с НГЭ. При исследовании фолликулярной жидкости от пациенток различных групп, были выявлены специфические маркеры в профиле метаболитов ФЖ пациенток с НГЭ. На основании полученных данных можно предположить, что наблюдаемое при эндометриозе изменение состава ФЖ может приводить к нарушениям гаметогенеза, а также влиять на процессы оплодотворения за счет формирования провоспалительного микроокружения и нарушения функции антиоксидантной защиты.

Различия в составе отработанных культуральных сред эмбрионов могут быть связаны с тем, что развитие ооцитов в провоспалительном микроокружении приводит к эпигенетическому перепрограммированию метаболических путей, которое сохраняется и на ранних этапах эмбриогенеза. В совокупности данные факторы могут приводить к снижению фертильности у больных эндометриозом.

В целом большинство метаболитов, полученных в нашей работе и о которых сообщают и другие исследователи, связаны с патофизиологией клеток эндометрия, но в каждом случае следует учитывать методологию, статистику и факторы окружающей среды. Тем не менее, исследование метаболома демонстрирует потенциал для объяснения механизмов, вовлеченных в эндометриоз. Представляется перспективным продолжение исследований в данном направлении, поскольку понимание причин изменения метаболических процессов позволит найти точки приложения для улучшения эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ у больных наружным генитальным эндометриозом.



## 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 декозагексаеновой 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 ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Huang XD, Sun ZY, Yu Q. Impact of endometriosis on embryo quality and endometrial receptivity in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol.* 2023 Feb 21;23(2):100733. doi: 10.1016/j.repbio.2023.100733. Epub ahead of print. PMID: 36821944.
2. Koninckx PR, Ussia A, Alsuwaidi S, Amro B, Keckstein J, Adamyan L, Donnez J, Martin MC, Wattiez A. Reconsidering evidence-based management of endometriosis. *Facts Views Vis Obgyn.* 2022 Sep;14(3):225-233. doi: 10.52054/FVVO.14.3.033. PMID: 36206797.
3. Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertil Steril.* 2017 Jul;108(1):19-27. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.031. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28602477; PMCID: PMC5629018.
4. Elizur SE, Aizer A, Yonish M, Shavit T, Orvieto R, Mashiach R, Cohen SB, Berkowitz E. Fertility preservation for women with ovarian endometriosis: results from a retrospective cohort study. *Reprod Biomed Online.* 2023 Feb;46(2):332-337. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.11.014. Epub 2022 Dec 2. PMID: 36564221.
5. Demirel, C., Bastu, E., Aydogdu, S. et al. The Presence of Endometrioma Does Not Impair Time-Lapse Morphokinetic Parameters and Quality of Embryos: A Study On Sibling Oocytes. *Reprod. Sci.* 23, 1053–1057 (2016). <https://doi.org/10.1177/1933719116630426>
6. Radzinsky VY, Orazov MR, Ivanov II, Khamoshina MB, Kostin IN, Kavteladze EV, Shustova VB. Implantation failures in women with infertility associated endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2019;35(sup1):27-30. doi: 10.1080/09513590.2019.1632089. PMID: 31532313.
7. Miravet-Valenciano J, Ruiz-Alonso M, Gómez E, Garcia-Velasco JA. Endometrial receptivity in eutopic endometrium in patients with

- endometriosis: it is not affected, and let me show you why. *Fertil Steril*. 2017 Jul;108(1):28-31. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.002. PMID: 28668152.
8. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с наружным генитальным эндометриозом / Е.В. Кулакова, О.С. Непша, А.Н. Екимов [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – № 11. – с. 104–112.
  9. Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, Dogan B. Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Syst Biol Reprod Med*. 2019 Feb;65(1):39-47. doi: 10.1080/19396368.2018.1478469. Epub 2018 May 28. PMID: 29806498.
  10. Adamyan LV, Starodubtseva N, Borisova A, Stepanian AA, Chagovets V, Salimova D, Wang Z, Kononikhin A, Popov I, Bugrova A, Chingin K, Kozachenko A, Chen H, Frankevich V. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2018 Mar-Apr;25(3):426-433. doi: 10.1016/j.jmig.2017.08.658. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28888701
  11. The American Fertility Society. Classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1979;32(5-6):633-4. 8. The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1985;43:351-2. 9. Revised American Society for Reproductive Medicine. Classification of endometriosis. 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21
  12. de Ziegler D, Pirtea P, Carbonnel M, Poulain M, Cicinelli E, Bulletti C, Kostaras K, Kontopoulos G, Keefe D, Ayoubi JM. Assisted reproduction in endometriosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019 Feb;33(1):47-59. doi: 10.1016/j.beem.2018.10.001. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30503728.
  13. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(6):659–667

14. Lamceva J, Uljanovs R, Strumfa I. The Main Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 21;24(5):4254. doi: 10.3390/ijms24054254. PMID: 36901685.
15. Signorile PG, Viceconte R, Baldi A. New Insights in Pathogenesis of Endometriosis. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Apr 28;9:879015. doi: 10.3389/fmed.2022.879015. PMID: 35572957; PMCID: PMC9095948.
16. D'Hooghe TM, Debrock S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update*. 2002 Jan-Feb;8(1):84-8. doi: 10.1093/humupd/8.1.84. PMID: 11866244.
17. Outcome of in vitro fertilization in endometriosis-associated infertility: a 5-year database cohort study. Lin XN, Wei ML, Tong XM, Xu WH, Zhou F, Huang QX, Wen GF, Zhang SY *Chin Med J (Engl)*. 2012 Aug; 125(15):2688-93.
18. Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*. 1994 Apr;9(4):725-9. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138578. PMID: 8046030
19. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet*. 2021 Feb 27;397(10276):839-852. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00389-5. PMID: 33640070
20. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997 Oct;68(4):585-96. doi: 10.1016/s0015-0282(97)00191-x. PMID: 9341595
21. Song Y, Liu J, Qiu Z, Chen D, Luo C, Liu X, Hua R, Zhu X, Lin Y, Li L, Liu W, Quan S. Advanced oxidation protein products from the follicular microenvironment and their role in infertile women with endometriosis. *Exp*

- Ther Med. 2018 Jan;15(1):479-486. doi: 10.3892/etm.2017.5390. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29387200; PMCID: PMC5769286
- 22.Kolanska K, Alijotas-Reig J, Cohen J, Cheloufi M, Selleret L, d'Argent E, Kayem G, Valverde EE, Fain O, Bornes M, Darai E, Mekinian A. Endometriosis with infertility: A comprehensive review on the role of immune deregulation and immunomodulation therapy. *Am J Reprod Immunol.* 2021 Mar;85(3):e13384. doi: 10.1111/aji.13384. Epub 2020 Dec 19. PMID: 33278837
- 23.Loh FH, Bongso A, Fong CY, Koh DR, Lee SH, Zhao HQ. Effects of peritoneal macrophages from women with endometriosis on endometrial cellular proliferation in an in vitro coculture model. *Fertil Steril.* 1999 Sep;72(3):533-8. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00292-7. PMID: 10519630
- 24.Li Y, Li R, Ouyang N, Dai K, Yuan P, Zheng L, Wang W. Investigating the impact of local inflammation on granulosa cells and follicular development in women with ovarian endometriosis. *Fertil Steril.* 2019 Nov;112(5):882-891.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.07.007. Epub 2019 Sep 21. PMID: 31551156
- 25.Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017 Jun;96(6):659-667. doi: 10.1111/aogs.13082. Epub 2017 Jan 30. PMID: 27998009
- 26.Paffoni A, Bolis V, Ferrari S, Benaglia L, Vercellini P, Somigliana E. The Gametotoxic Effects of the Endometrioma Content: Insights From a Parthenogenetic Human Model. *Reprod Sci.* 2019 May;26(5):573-579. doi: 10.1177/1933719118777637. Epub 2018 May 20. PMID: 29779474
- 27.Sanchez AM, Pagliardini L, Cermisoni GC, Privitera L, Makieva S, Alteri A, Corti L, Rabellotti E, Candiani M, Viganò P. Does Endometriosis Influence the Embryo Quality and/or Development? Insights from a Large Retrospective Matched Cohort Study. *Diagnostics (Basel).* 2020 Feb

- 3;10(2):83. doi: 10.3390/diagnostics10020083. PMID: 32028668; PMCID: PMC7168899
28. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod*. 2016 Oct;22(10):704-718. doi: 10.1093/molehr/gaw057. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578774
29. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, Rienzi L. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7193075. doi: 10.1155/2016/7193075. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26942198; PMCID: PMC4749789
30. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet*. 2012 Feb;131(2):175-86. doi: 10.1007/s00439-011-1056-z. Epub 2011 Jul 12. PMID: 21748341
31. Xu B, Guo N, Zhang XM, Shi W, Tong XH, Iqbal F, Liu YS. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. *Sci Rep*. 2015 May 29;5:10779. doi: 10.1038/srep10779. PMID: 26022105; PMCID: PMC4448226
32. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod*. 2012 Aug;27 Suppl 1:i2-21. doi: 10.1093/humrep/des200. Epub 2012 Jul 18. PMID: 22811312
33. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*. 2011 Jan-Feb;17(1):34-45. doi: 10.1093/humupd/dmq029. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20639518; PMCID: PMC3001337
34. Scantamburlo VM, Linsingen RV, Centa LJR, Toso KFD, Scaraboto D, Araujo Júnior E, Kulak Junior J. Association between decreased ovarian reserve and poor oocyte quality. *Obstet Gynecol Sci*. 2021 Nov;64(6):532-539. doi: 10.5468/ogs.20168. Epub 2021 Oct 19. PMID: 34663062; PMCID: PMC8595049



35. Sanchez AM, Vanni VS, Bartiromo L, Papaleo E, Zilberberg E, Candiani M, Orvieto R, Viganò P. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *J Ovarian Res.* 2017 Jul 12;10(1):43. doi: 10.1186/s13048-017-0341-4. PMID: 28701212; PMCID: PMC5508680
36. Goud PT, Goud AP, Joshi N, Puscheck E, Diamond MP, Abu-Soud HM. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):151-159.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.053. Epub 2014 May 10. Erratum in: *Fertil Steril.* 2014 Sep;102(3):908. PMID: 24825428
37. Boucret L, Bouet PE, Riou J, Legendre G, Delbos L, Hachem HE, Descamps P, Reynier P, May-Panloup P. Endometriosis Lowers the Cumulative Live Birth Rates in IVF by Decreasing the Number of Embryos but Not Their Quality. *J Clin Med.* 2020 Aug 1;9(8):2478. doi: 10.3390/jcm9082478. PMID: 32752267; PMCID: PMC7464781
38. Dongye H, Ji X, Ma X, Song J, Yan L. The Impact of Endometriosis on Embryo Quality in *in-vitro* Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2021 Jun 2;8:669342. doi: 10.3389/fmed.2021.669342. PMID: 34150804; PMCID: PMC8206501
39. Sanchez AM, Viganò P, Somigliana E, Panina-Bordignon P, Vercellini P, Candiani M. The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. *Hum Reprod Update.* 2014 Mar-Apr;20(2):217-30. doi: 10.1093/humupd/dmt053. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24129684
40. Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet.* 2018 May;35(5):735-751. doi: 10.1007/s10815-018-1143-3. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29497954; PMCID: PMC5984887

41. Kitajima M, Dolmans MM, Donnez O, Masuzaki H, Soares M, Donnez J. Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas. *Fertil Steril*. 2014 Apr;101(4):1031-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.049. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24502890
42. Santulli P, Lamau MC, Marcellin L, Gayet V, Marzouk P, Borghese B, Lafay Pillet MC, Chapron C. Endometriosis-related infertility: ovarian endometrioma per se is not associated with presentation for infertility. *Hum Reprod*. 2016 Aug;31(8):1765-75. doi: 10.1093/humrep/dew093. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27130614
43. Bougie O, McClintock C, Pudwell J, Brogly SB, Velez MP. Long-term follow-up of endometriosis surgery in Ontario: a population-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2021 Sep;225(3):270.e1-270.e19. doi: 10.1016/j.ajog.2021.04.237. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33894154
44. Orazov MR, Radzinsky VY, Ivanov II, Khamoshina MB, Shustova VB. Oocyte quality in women with infertility associated endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2019;35(sup1):24-26. doi: 10.1080/09513590.2019.1632088. PMID: 31532315
45. Robin C, Uk A, Decanter C, Behal H, Collinet P, Rubod C, Barbotin AL, Robin G. Impact of endometriosis on oocyte morphology in IVF-ICSI: retrospective study of a cohort of more than 6000 mature oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021 Oct 16;19(1):160. doi: 10.1186/s12958-021-00798-x. PMID: 34656130; PMCID: PMC8522159
46. Boynukalin FK, Serdarogullari M, Gultomruk M, Coban O, Findikli N, Bahceci M. The impact of endometriosis on early embryo morphokinetics: a case-control study. *Syst Biol Reprod Med*. 2019 Jun;65(3):250-257. doi: 10.1080/19396368.2019.1573275. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30741013
47. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod*. 2016 Oct;22(10):704-718. doi: 10.1093/molehr/gaw057. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578774

48. Horton J, Sterrenburg M, Lane S, Maheshwari A, Li TC, Cheong Y. Reproductive, obstetric, and perinatal outcomes of women with adenomyosis and endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019 Sep 11;25(5):592-632. doi: 10.1093/humupd/dmz012. PMID: 31318420
49. Reig A, Franasiak J, Scott RT Jr, Seli E. The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Mar;37(3):595-602. doi: 10.1007/s10815-020-01739-0. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32173784; PMCID: PMC7125286
50. Yuan P, Zheng L, Ou S, Zhao H, Li R, Luo H, Tan X, Zhang Q, Wang W. Evaluation of chromosomal abnormalities from preimplantation genetic testing to the reproductive outcomes: a comparison between three different structural rearrangements based on next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*. 2021 Mar;38(3):709-718. doi: 10.1007/s10815-020-02053-5. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33409753; PMCID: PMC7910334
51. Juneau C, Kraus E, Werner M, Franasiak J, Morin S, Patounakis G, Molinaro T, de Ziegler D, Scott RT. Patients with endometriosis have aneuploidy rates equivalent to their age-matched peers in the in vitro fertilization population. *Fertil Steril*. 2017 Aug;108(2):284-288. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.038. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651959
52. Vaiarelli A, Venturella R, Cimadomo D, Conforti A, Pedri S, Bitonti G, Iussig B, Gentile C, Alviggi E, Santopaolo S, Zullo F, Rienzi L, Ubaldi FM. Endometriosis shows no impact on the euploid blastocyst rate per cohort of inseminated metaphase-II oocytes: A case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Jan;256:205-210. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.11.024. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33246206
53. Zhou D, Nie ZW, Cui XS. EB1 Is Essential for Spindle Formation and Chromosome Alignment During Oocyte Meiotic Maturation in Mice. *Microsc Microanal*. 2021 Apr;27(2):385-391. doi: 10.1017/S1431927620024897. PMID: 33413706

54. Juneau C, Kraus E, Werner M, Franasiak J, Morin S, Patounakis G, Molinaro T, de Ziegler D, Scott RT. Patients with endometriosis have aneuploidy rates equivalent to their age-matched peers in the in vitro fertilization population. *Fertil Steril*. 2017 Aug;108(2):284-288. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.038. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651959
55. Hernández-Vargas P, Muñoz M, Domínguez F. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update*. 2020 Feb 28;26(2):264-301. doi: 10.1093/humupd/dmz042. PMID: 32096829
56. Doroftei B, Ilie OD, Puiu M, Ciobica A, Ilea C. Mini-Review Regarding the Applicability of Genome Editing Techniques Developed for Studying Infertility. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Feb 5;11(2):246. doi: 10.3390/diagnostics11020246. PMID: 33562517; PMCID: PMC7915733
57. Capalbo A, Poli M, Riera-Escamilla A, Shukla V, Kudo Høffding M, Krausz C, Hoffmann ER, Simon C. Preconception genome medicine: current state and future perspectives to improve infertility diagnosis and reproductive and health outcomes based on individual genomic data. *Hum Reprod Update*. 2021 Feb 19;27(2):254-279. doi: 10.1093/humupd/dmaa044. PMID: 33197264
58. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jul;29(1):32-58. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.02.013. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24813754
59. Guo X, Li TC, Chen X. The endometrial proteomic profile around the time of embryo implantation†. *Biol Reprod*. 2021 Jan 4;104(1):11-26. doi: 10.1093/biolre/ioaa150. PMID: 32856701
60. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002 Jan;48(1-2):155-71. PMID: 11860207
61. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool

- ("metabolome") analysis. *J Bacteriol.* 1998 Oct;180(19):5109-16. doi: 10.1128/JB.180.19.5109-5116.1998. PMID: 9748443; PMCID: PMC107546
62. Tokarz J, Adamski J, Rižner TL. Metabolomics for Diagnosis and Prognosis of Uterine Diseases? A Systematic Review. *J Pers Med.* 2020 Dec 21;10(4):294. doi: 10.3390/jpm10040294. PMID: 33371433; PMCID: PMC7767462
63. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D521-6. doi: 10.1093/nar/gkl923. PMID: 17202168; PMCID: PMC1899095
64. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril.* 2013 Mar 15;99(4):1062-72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23312219
65. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod.* 2011 Aug;26(8):1981-6. doi: 10.1093/humrep/der143. Epub 2011 May 13. PMID: 21572086
66. Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008 Dec;90(6):2183-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1739. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18842260
67. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in

- women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007 Nov;88(5):1350-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1390. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923129
- 68.Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007 Nov;88(5):1350-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1390. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923129
- 69.Prieto L, Quesada JF, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, Garcia-Velasco JA. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):126-30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.052. Epub 2012 May 10. PMID: 22578534
- 70.Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J, Eberlin MN, Zylbersztejn DS, Cedenho AP, Turco EG. Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Dec;32(12):1817-25. doi: 10.1007/s10815-015-0592-1. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26497128; PMCID: PMC4681741
- 71.Marianna S, Alessia P, Susan C, Francesca C, Angela S, Francesca C, Antonella N, Patrizia I, Nicola C, Emilio C. Metabolomic profiling and biochemical evaluation of the follicular fluid of endometriosis patients. *Mol Biosyst*. 2017 Jun 1;13(6):1213-1222. doi: 10.1039/c7mb00181a. Epub 2017 May 5. Erratum in: *Mol Biosyst*. 2017 May 30;13(6):1246. PMID: 28475193
- 72.Vouk K, Ribič-Pucelj M, Adamski J, Rižner TL. Altered levels of acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelins in peritoneal fluid from ovarian endometriosis patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 May;159:60-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.023. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26921767

73. Bouet PE, Chao de la Barca JM, El Hachem H, Descamps P, Legendre G, Reynier P, May-Panloup P. Metabolomics shows no impairment of the microenvironment of the cumulus-oocyte complex in women with isolated endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2019 Dec;39(6):885-892. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.08.001. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31628036
74. Castiglione Morelli MA, Iuliano A, Schettini SCA, Petruzzi D, Ferri A, Colucci P, Viggiani L, CuvIELLO F, Ostuni A. NMR metabolic profiling of follicular fluid for investigating the different causes of female infertility: a pilot study. *Metabolomics*. 2019 Jan 29;15(2):19. doi: 10.1007/s11306-019-1481-x. PMID: 30830455
75. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH, Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod*. 2008 Jul;23(7):1499-504. doi: 10.1093/humrep/den111. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18424459
76. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*. 2001 Dec;76(6):1175-80. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02888-6. PMID: 11730746
77. Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod*. 1993 Apr;48(4):798-806. doi: 10.1095/biolreprod48.4.798. PMID: 8485244
78. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003 Jan-Feb;9(1):35-48. doi: 10.1093/humupd/dmg009. PMID: 12638780
79. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence.

- Reproduction. 2010 Apr;139(4):685-95. doi: 10.1530/REP-09-0345. Epub 2010 Jan 20. PMID: 20089664
80. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*. 2013 Mar 15;99(4):1062-72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23312219
81. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007 Nov;88(5):1350-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1390. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923129
82. Lo Turco EG, Souza GH, Garcia JS, Ferreira CR, Eberlin MN, Bertolla RP. Effect of endometriosis on the protein expression pattern of follicular fluid from patients submitted to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2010 Jul;25(7):1755-66. doi: 10.1093/humrep/deq102. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427520
83. Vouk K, Hevir N, Ribić-Pucelj M, Haarpaintner G, Scherb H, Osredkar J, Möller G, Prehn C, Rižner TL, Adamski J. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2012 Oct;27(10):2955-65. doi: 10.1093/humrep/des152. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22859507
84. Da Broi MG, Navarro PA. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. *Cell Tissue Res*. 2016 Apr;364(1):1-7. doi: 10.1007/s00441-015-2339-9. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26685866
85. Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J, Eberlin MN, Zylbersztejn DS, Cedenho AP, Turco EG. Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2015



- Dec;32(12):1817-25. doi: 10.1007/s10815-015-0592-1. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26497128; PMCID: PMC4681741
86. Cordeiro FB, Montani DA, Pilau EJ, Gozzo FC, Fraietta R, Turco EGL. Ovarian environment aging: follicular fluid lipidomic and related metabolic pathways. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Aug;35(8):1385-1393. doi: 10.1007/s10815-018-1259-5. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30014448; PMCID: PMC6086795
87. Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1894-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.043. Epub 2009 Nov 6. PMID: 19896655
88. Sun Z, Song J, Zhang X, Wang A, Guo Y, Yang Y, Wang X, Xu K, Deng J. Novel SWATH<sup>TM</sup> technology for follicular fluid metabolomics in patients with endometriosis. *Pharmazie.* 2018 Jun 1;73(6):318-323. doi: 10.1691/ph.2018.7193. PMID: 29880083
89. Sun Z, Song J, Zhang X, Wang A, Guo Y, Yang Y, Wang X, Xu K, Deng J. Novel SWATH<sup>TM</sup> technology for follicular fluid metabolomics in patients with endometriosis. *Pharmazie.* 2018 Jun 1;73(6):318-323. doi: 10.1691/ph.2018.7193. PMID: 29880083
90. Lee D, Moawad AR, Morielli T, Fernandez MC, O'Flaherty C. Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 2017 Feb 10;23(2):106-115. doi: 10.1093/molehr/gaw081. PMID: 28025393; PMCID: PMC5388279
91. Sáez-Espinosa P, Velasco I, Lorca P, Acién MI, Romero A, Gómez-Torres MJ. Peritoneal fluid from women with endometriosis impairs human spermatozoa functionality. *Reprod Biol.* 2020 Mar;20(1):81-87. doi: 10.1016/j.repbio.2019.12.001. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31864823
92. Khanaki K, Nouri M, Ardekani AM, Ghassemzadeh A, Shahnazi V, Sadeghi MR, Darabi M, Mehdizadeh A, Dolatkhah H, Saremi A, Imani AR, Rahimpour A. Evaluation of the relationship between endometriosis and

- omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Iran Biomed J.* 2012;16(1):38-43. doi: 10.6091/ibj.1025.2012. PMID: 22562031; PMCID: PMC3614254
93. Bracewell-Milnes T, Saso S, Abdalla H, Nikolau D, Norman-Taylor J, Johnson M, Holmes E, Thum MY. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2017 Nov 1;23(6):723-736. doi: 10.1093/humupd/dmx023. PMID: 29069503
94. Zmuidinaite R, Sharara FI, Iles RK. Current Advancements in Noninvasive Profiling of the Embryo Culture Media Secretome. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 3;22(5):2513. doi: 10.3390/ijms22052513. PMID: 33802374; PMCID: PMC7959312
95. Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. *Reprod Fertil Dev.* 2015 May;27(4):638-54. doi: 10.1071/RD14421. PMID: 25751298
96. Huang XD, Sun ZY, Yu Q. Impact of endometriosis on embryo quality and endometrial receptivity in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol.* 2023 Feb 21;23(2):100733. doi: 10.1016/j.repbio.2023.100733. Epub ahead of print. PMID: 36821944
97. Kolanska K, Cohen J, Bendifallah S, Selleret L, Antoine JM, Chabbert-Buffet N, Darai E, d'Argent EM. Pregnancy outcomes after controlled ovarian hyperstimulation in women with endometriosis-associated infertility: GnRH-agonist versus GnRH-antagonist. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2017 Nov;46(9):681-686. doi: 10.1016/j.jogoh.2017.09.007. Epub 2017 Sep 29. PMID: 28970135
98. Yu Y, Wei K, Yao Q, Tian S, Liang K, Zhou L, Wang L, Jin M. [Controlled ovarian stimulation protocols in endometriosis patients: with antagonist or agonist?]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2019 Apr 25;48(2):165-173. Chinese. doi: 10.3785/j.issn.1008-9292.2019.04.07. PMID: 31309754; PMCID: PMC8800656

99. Cardenas Armas DF, Peñarrubia J, Goday A, Guimerá M, Vidal E, Manau D, Fabregues F. Frozen-thawed blastocyst transfer in natural cycle increase implantation rates compared artificial cycle. *Gynecol Endocrinol.* 2019 Oct;35(10):873-877. doi: 10.1080/09513590.2019.1600668. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30973031
100. Sanchez AM, Vanni VS, Bartiromo L, Papaleo E, Zilberberg E, Candiani M, Orvieto R, Viganò P. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *J Ovarian Res.* 2017 Jul 12;10(1):43. doi: 10.1186/s13048-017-0341-4. PMID: 28701212; PMCID: PMC5508680
101. Goud PT, Goud AP, Joshi N, Puscheck E, Diamond MP, Abu-Soud HM. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):151-159.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.053. Epub 2014 May 10. Erratum in: *Fertil Steril.* 2014 Sep;102(3):908. PMID: 24825428
102. Borges E Jr, Braga DP, Setti AS, Vingris LS, Figueira RC, Iaconelli A Jr. Endometriosis Affects Oocyte Morphology in Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles? *JBRA Assist Reprod.* 2015 Nov 1;19(4):235-40. doi: 10.5935/1518-0557.20150046. PMID: 27203199
103. Vaiarelli A, Venturella R, Cimadomo D, Conforti A, Pedri S, Bitonti G, Iussig B, Gentile C, Alviggi E, Santopaolo S, Zullo F, Rienzi L, Ubaldi FM. Endometriosis shows no impact on the euploid blastocyst rate per cohort of inseminated metaphase-II oocytes: A case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021 Jan;256:205-210. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.11.024. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33246206
104. Freis A, Dietrich JE, Binder M, Holschbach V, Strowitzki T, Germeyer A. Relative Morphokinetics Assessed by Time-Lapse Imaging Are Altered in Embryos From Patients With Endometriosis. *Reprod Sci.* 2018 Aug;25(8):1279-1285. doi: 10.1177/1933719117741373. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29141509

105. Ortiz CN, Torres-Reverón A, Appleyard CB. Metabolomics in endometriosis: challenges and perspectives for future studies. *Reprod Fertil.* 2021 May 6;2(2):R35-R50. doi: 10.1530/RAF-20-0047. PMID: 35128453; PMCID: PMC8812441
106. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Singhal S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Y, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D608-D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089. PMID: 29140435; PMCID: PMC5753273
107. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science.* 2005 Jun 10;308(5728):1587-9. doi: 10.1126/science.1111445. PMID: 15947176
108. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Aug;85(8):2897-902. doi: 10.1210/jcem.85.8.6739. PMID: 10946900
109. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology.* 2007 Aug;148(8):3814-26. doi: 10.1210/en.2006-1692. Epub 2007 May 17. PMID: 17510236
110. Patel BG, Rudnicki M, Yu J, Shu Y, Taylor RN. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017 Jun;96(6):623-632. doi: 10.1111/aogs.13156. PMID: 28423456
111. Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem.* 2002 Jul;132(1):7-12. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003200. PMID: 12097154

112. Resuehr D, Glore DR, Taylor HS, Bruner-Tran KL, Osteen KG. Progesterone-dependent regulation of endometrial cannabinoid receptor type 1 (CB1-R) expression is disrupted in women with endometriosis and in isolated stromal cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):948-56.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.009. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22789143; PMCID: PMC3462249
113. Horne AW, Phillips JA 3rd, Kane N, Lourenco PC, McDonald SE, Williams AR, Simon C, Dey SK, Critchley HO. CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. *PLoS One*. 2008;3(12):e3969. doi: 10.1371/journal.pone.0003969. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19093002; PMCID: PMC2601032
114. Bouaziz J, Bar On A, Seidman DS, Soriano D. The Clinical Significance of Endocannabinoids in Endometriosis Pain Management. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017 Apr 1;2(1):72-80. doi: 10.1089/can.2016.0035. PMID: 28861506; PMCID: PMC5436335
115. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One*. 2009;4(2):e4579. doi: 10.1371/journal.pone.0004579. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19238202; PMCID: PMC2640464
116. Fonseca BM, Moreira-Pinto B, Costa L, Felgueira E, Oliveira P, Rebelo I. Concentrations of the endocannabinoid N-arachidonylethanolamine in the follicular fluid of women with endometriosis: the role of M1 polarised macrophages. *Reprod Fertil Dev*. 2021 Feb;33(4):270-278. doi: 10.1071/RD20247. PMID: 33551019
117. Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc*. 2001 Sep;34(3):166-73. doi: 10.1007/s007950100011. PMID: 11793192
118. Белоус Ю. А., Комаревцева И. А., Комаревцева Е. В. Влияние опиоидов на окислительный стресс и сфингозиновый путь активации

- апоптоза в почках // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2009. №3 URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-opioidov-na-okislitelnyy-stress-i-sfingozinovyy-put-aktivatsii-apoptoza-v-pochkah> (дата обращения: 06.06.2022).
119. Lee YH, Tan CW, Venkatratnam A, Tan CS, Cui L, Loh SF, Griffith L, Tannenbaum SR, Chan JK. Dysregulated sphingolipid metabolism in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct;99(10):E1913-21. doi: 10.1210/jc.2014-1340. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24960545; PMCID: PMC5393497
120. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2005 May;46(5):839-61. doi: 10.1194/jlr.E400004-JLR200. Epub 2005 Feb 16. Erratum in: *J Lipid Res.* 2010 Jun;51(6):1618. PMID: 15722563
121. Chrobak A, Sieradzka U, Sozański R, Chełmońska-Soyta A, Gabryś M, Jerzak M. Ectopic and eutopic stromal endometriotic cells have a damaged ceramide signaling pathway to apoptosis. *Fertil Steril.* 2009 Dec;92(6):1834-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.035. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19019359
122. Vouk K, Hevir N, Ribić-Pucelj M, Haarpaintner G, Scherb H, Osredkar J, Möller G, Prehn C, Rižner TL, Adamski J. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2012 Oct;27(10):2955-65. doi: 10.1093/humrep/des152. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22859507
123. Adamyan LV, Starodubtseva N, Borisova A, Stepanian AA, Chagovets V, Salimova D, Wang Z, Kononikhin A, Popov I, Bugrova A, Chingin K, Kozachenko A, Chen H, Frankevich V. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with

- Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2018 Mar-Apr;25(3):426-433. doi: 10.1016/j.jmig.2017.08.658. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28888701
124. Lee J, Yeganeh B, Ermini L, Post M. Sphingolipids as cell fate regulators in lung development and disease. *Apoptosis.* 2015 May;20(5):740-57. doi: 10.1007/s10495-015-1112-6. PMID: 25753687; PMCID: PMC4376961
125. Farine L, Niemann M, Schneider A, Bütikofer P. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis by the Kennedy pathway occurs at different sites in *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep.* 2015 Nov 18;5:16787. doi: 10.1038/srep16787. PMID: 26577437; PMCID: PMC4649479
126. Vouk K, Hevir N, Ribić-Pucelj M, Haarpaintner G, Scherb H, Osredkar J, Möller G, Prehn C, Rižner TL, Adamski J. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2012 Oct;27(10):2955-65. doi: 10.1093/humrep/des152. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22859507
127. Khanaki K, Nouri M, Ardekani AM, Ghassemzadeh A, Shahnazi V, Sadeghi MR, Darabi M, Mehdizadeh A, Dolatkhah H, Saremi A, Imani AR, Rahimpour A. Evaluation of the relationship between endometriosis and omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Iran Biomed J.* 2012;16(1):38-43. doi: 10.6091/ibj.1025.2012. PMID: 22562031; PMCID: PMC3614254
128. Pereira FEXG, Medeiros FDC, Rocha HAL, Silva KSD. Effects of omega-6/3 and omega-9/6 nutraceuticals on pain and fertility in peritoneal endometriosis in rats. *Acta Cir Bras.* 2019 May 6;34(4):e201900405. doi: 10.1590/s0102-865020190040000005. PMID: 31066787; PMCID: PMC6583929
129. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS (2013) Микробные метаболиты, жирные

- кислоты с короткой цепью, регулируют гомеостаз Трег-клеток толстой кишки . *Наука* 341 : 569–573. 10.1126/science.1241165
130. Licciardi PV, Ververis K, Karagiannis TC. Histone deacetylase inhibition and dietary short-chain Fatty acids. *ISRN Allergy*. 2011 Dec 26;2011:869647. doi: 10.5402/2011/869647. PMID: 23724235; PMCID: PMC3658706
  131. Chadchan SB, Popli P, Ambati CR, Tycksen E, Han SJ, Bulun SE, Putluri N, Biest SW, Kommagani R. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids protect against the progression of endometriosis. *Life Sci Alliance*. 2021 Sep 30;4(12):e202101224. doi: 10.26508/lsa.202101224. PMID: 34593556; PMCID: PMC8500332
  132. Chadchan SB, Popli P, Ambati CR, Tycksen E, Han SJ, Bulun SE, Putluri N, Biest SW, Kommagani R. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids protect against the progression of endometriosis. *Life Sci Alliance*. 2021 Sep 30;4(12):e202101224. doi: 10.26508/lsa.202101224. PMID: 34593556; PMCID: PMC8500332
  133. Vicente-Muñoz S, Morcillo I, Puchades-Carrasco L, Payá V, Pellicer A, Pineda-Lucena A. Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 2015 Nov;104(5):1202-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1149. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26297644
  134. Jana SK, Dutta M, Joshi M, Srivastava S, Chakravarty B, Chaudhury K. <sup>1</sup>H NMR based targeted metabolite profiling for understanding the complex relationship connecting oxidative stress with endometriosis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:329058. doi: 10.1155/2013/329058. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23984345; PMCID: PMC3747613
  135. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlings HM, Lum A, Jones S, Senz J, Seckin T, Ho J, Wu RC, Lac V, Ogawa H, Tessier-Cloutier B, Alhassan R, Wang A, Wang Y, Cohen JD, Wong F, Hasanovic A, Orr N, Zhang M, Popoli M, McMahon W, Wood LD, Mattox



- A, Allaire C, Segars J, Williams C, Tomasetti C, Boyd N, Kinzler KW, Gilks CB, Diaz L, Wang TL, Vogelstein B, Yong PJ, Huntsman DG, Shih IM. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med*. 2017 May 11;376(19):1835-1848. doi: 10.1056/NEJMoa1614814. PMID: 28489996; PMCID: PMC5555376
136. Kobayashi H, Shigetomi H, Imanaka S. Nonhormonal therapy for endometriosis based on energy metabolism regulation. *Reprod Fertil*. 2021 Nov 25;2(4):C42-C57. doi: 10.1530/RAF-21-0053. PMID: 35118411; PMCID: PMC8788578
137. Pocate-Cheriet K, Santulli P, Kateb F, Bourdon M, Maignien C, Batteux F, Chouzenoux S, Patrat C, Wolf JP, Bertho G, Chapron C. The follicular fluid metabolome differs according to the endometriosis phenotype. *Reprod Biomed Online*. 2020 Dec;41(6):1023-1037. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.09.002. Epub 2020 Sep 4. PMID: 33046374
138. Li J, Guan L, Zhang H, Gao Y, Sun J, Gong X, Li D, Chen P, Liang X, Huang M, Bi H. Endometrium metabolomic profiling reveals potential biomarkers for diagnosis of endometriosis at minimal-mild stages. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Apr 30;16(1):42. doi: 10.1186/s12958-018-0360-z. Erratum in: *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Nov 6;17(1):89. PMID: 29712562; PMCID: PMC5928574
139. Piñero-Sagredo E, Nunes S, de Los Santos MJ, Celda B, Esteve V. NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR Biomed*. 2010 Jun;23(5):485-95. doi: 10.1002/nbm.1488. PMID: 20336675
140. Atkins HM, Bharadwaj MS, O'Brien Cox A, Furdui CM, Appt SE, Caudell DL. Endometrium and endometriosis tissue mitochondrial energy metabolism in a nonhuman primate model. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Aug 24;17(1):70. doi: 10.1186/s12958-019-0513-8. PMID: 31445519; PMCID: PMC6708555
141. K.K. Dhillon, S. Gupta *Biochemistry, Ketogenesis* StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) (2020)

142. Le Foll C, Levin BE. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Jun 1;310(11):R1186-92. doi: 10.1152/ajpregu.00113.2016. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27122369; PMCID: PMC4935491
143. Williams NC, O'Neill LAJ. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Feb 5;9:141. doi: 10.3389/fimmu.2018.00141. PMID: 29459863; PMCID: PMC5807345
144. Zhu SY, Wu YS, Gu ZY, Zhang J, Jia SZ, Shi JH, Dai Y, Leng JH, Li XY. Preventive therapeutic options for postoperative recurrence of ovarian endometrioma: gonadotropin-releasing hormone agonist with or without levonorgestrel intrauterine system insertion. *Arch Gynecol Obstet*. 2021 Feb;303(2):533-539. doi: 10.1007/s00404-020-05843-5. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33104866.
145. Halpern G, Schor E, Kopelman A. Nutritional aspects related to endometriosis. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2015 Nov-Dec;61(6):519-23. doi: 10.1590/1806-9282.61.06.519. PMID: 26841161.