

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

*На правах рукописи*

**ФИЛИППОВА**

**Елена Сергеевна**

**ТАКТИКА ВЕДЕНИЯ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С**  
**ЭНДОМЕТРИОИДНЫМИ КИСТАМИ ЯИЧНИКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ**  
**СОСТОЯНИЯ ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА**

**14.01.01 – Акушерство и гинекология**

**Диссертация на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Научные руководители:**

**кандидат медицинских наук**

**Козаченко И.Ф.**

**кандидат химических наук**

**Бобров М.Ю.**

**Москва - 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Оглавление</b> .....	2
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. Современный взгляд на овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников. (Обзор литературы)</b> .....	14
1.1 История изучения патофизиологии эндометриоидных кист яичников.....	14
1.2 Классификация эндометриоидных кист яичников.....	16
1.3 Клиническая картина эндометриоидных кист яичников.....	21
1.4 Понятие «овариальный резерв».....	24
1.5 Факторы снижения овариального резерва при ЭКЯ.....	24
1.6 Влияние эндометриоидных кист яичников на овариальный резерв.....	26
1.7 Критерии оценки овариального резерва.....	31
1.8 Молекулярные маркеры снижения овариального резерва.....	34
1.9 Влияние хирургического лечения ЭКЯ на овариальный резерв.....	37
1.10 Выбор энергии при удалении эндометриоидных кист яичников с позиции сохранения овариального резерва.....	41
1.11 Влияние хирургического лечения ЭКЯ у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на результаты экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).....	46
1.12 Тактика ведения женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ в послеоперационном периоде.....	49
1.13 Заключение.....	52
<b>ГЛАВА 2. Материал и методы исследования</b> .....	53
2.1 Материалы исследования.....	53
2.2 Методы исследования.....	56
2.2.1 Клинические методы исследования.....	56
2.2.2 Лабораторные методы исследования.....	57
2.2.3 Инструментальные методы исследования.....	58

2.2.4 Хирургические методы обследования и лечения.....	59
2.2.5 Морфологическое исследование.....	61
2.3 Статистическая обработка данных.....	62
2.3.1 Статистическая обработка клинико – лабораторных данных.....	62
2.3.2 Транскриптомный анализ.....	62
2.3.3 Вестерн – блот анализ.....	63
2.3.4 Биоинформационная обработка данных.....	64
<b>ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований.....</b>	<b>66</b>
3.1 Клинико – лабораторная характеристика и состояние овариального резерва женщин репродуктивного возраста с эндометриодными кистами яичников на этапе до хирургического лечения.....	66
3.2 Состояние овариального резерва женщин репродуктивного возраста после оперативного лечения по поводу эндометриодных кист яичников.....	80
3.3 Анализ репродуктивной функции женщин репродуктивного возраста после операции по поводу ЭКЯ.....	90
3.4 Исследование экспрессии микроРНК в тканях эндометрия при низком и нормальном овариальном резерве.....	94
3.5 Транскриптомный анализ экспрессии генов в тканях эндометрия.....	103
<b>ГЛАВА 4. Обсуждение полученных результатов.....</b>	<b>109</b>
<b>Заключение.....</b>	<b>129</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>131</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>133</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>135</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>139</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	<b>163</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В структуре гинекологической заболеваемости эндометриоз занимает третье место после воспалительных заболеваний половых органов и миомы матки [1; 26]. Во всем мире эндометриозом страдает около 176 млн. женщин репродуктивного возраста и частота заболеваемости данной патологией продолжает ежегодно расти [127]. По данным Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения в 2016 году в Российской Федерации впервые диагноз эндометриоз был установлен у 99857 женщин (155,0 на 100000 населения), в 2017 году эта цифра составила 100108 женщин (155,6 на 100000 населения) [2].

Наиболее частой формой эндометриоза являются эндометриоидные кисты яичников (ЭКЯ). Среди женщин репродуктивного возраста, страдающих эндометриозом, ЭКЯ выявляются в 20 – 40% случаев [127]. По мнению ряда ученых [3; 18], поражению яичников часто предшествует появление эндометриоидных имплантов на брюшине, либо эндометриоидная киста может развиваться из поверхностного очага эндометриоза, контактирующего с корковым слоем яичников или в ассоциации с функциональными кистами. Уже на данной стадии развития женщин может беспокоить дисменорея, диспареуния, боли в области таза. Несмотря на то, что первичная манифестация симптомов эндометриоза (по данным Международной Ассоциации Эндометриоза) возникает в 21% случаев до 15 лет, в 17% в возрасте между 15 и 19 годами, диагноз устанавливается в среднем через 7 – 8 лет после появления жалоб. ЭКЯ обнаруживаются в основном при ультразвуковом исследовании, либо во время лапароскопии по поводу бесплодия (20 – 55%) [127; 128]. Лапароскопия признана «золотым стандартом» в лечении доброкачественных образований яичников. В настоящее время влияние лапароскопической цистэктомии на овариальный резерв является предметом дискуссий. Широко обсуждается вопрос о влиянии различных методов хирургического лечения ЭКЯ на степень повреждения яичниковой ткани и сохранность овариального резерва в зависимости от применения тех или иных видов хирургической энергии.

Таким образом, очевидна необходимость разработки и внедрения в практику точных неинвазивных биомаркеров эндометриоза, позволяющих выявить данное заболевание на начальных стадиях его развития.

Знание патогенеза эндометриоидных кист яичников и раннее их выявление позволит разработать лечебные и профилактические методы и предотвратить развитие бесплодия у пациенток репродуктивного возраста. Несмотря на большое число исследований, патогенез ЭКЯ до конца не изучен. По настоящее время отсутствуют неинвазивные маркеры эндометриоза, позволяющие на раннем дохирургическом этапе установить точный диагноз, снизить прогрессирование заболевания и предотвратить последующее бесплодие.

В последнее время активно исследуется роль микроРНК (мкРНК) в регуляции экспрессии генов как в норме, так и при патологии. мкРНК играют роль пост-транскрипционных репрессоров за счет взаимодействия с мРНК-мишенями, что приводит либо к деградации соответствующей мРНК, либо к остановке трансляции [4; 5]. По некоторым оценкам мкРНК способны регулировать экспрессию более 60% белок-кодирующих генов и участвуют в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, воспаления, апоптоза, гемопоеза, эмбрионального развития и онкогенеза. Таким образом, изменение экспрессии мкРНК может способствовать как дальнейшему развитию патологического очага, так и вовлечению окружающих тканей в патологический процесс. Поскольку ткани кисты интимно прилежат к тканям яичника, можно предположить, что специфические изменения экспрессии генов и мкРНК в тканях кисты могут отражать как течение патологического процесса, так и особенности взаимодействия тканей эктопического эндометрия и тканей яичника. В этой связи, изучение экспрессии мкРНК и их потенциальных генов-мишеней в тканях эндометрия различной локализации может способствовать выявлению патогенетических факторов развития эндометриоза и снижения овариального резерва.

## **Степень разработанности темы**

Эндометриоз, как причина бесплодия, занимает второе место после воспалительных заболеваний матки и придатков. До 40% больных ЭКЯ сталкиваются с проблемами бесплодия [6; 7]. Существующие возможности хирургического и медикаментозного лечения эндометриоза помогают получить долгожданную беременность лишь у 15 – 25% пациенток. При этом в течение первого года после операции частота наступления беременности колеблется от 20% до 50% и снижается на 4% каждый последующий год [127; 128]. Причина бесплодия при ЭКЯ многофакторна и является серьезной медико – социальной проблемой. Как хирургическое вмешательство на яичниках по поводу эндометриоидных кист, так и сами кисты могут быть причиной бесплодия. У больных с ЭКЯ бесплодие связывают с сокращением овариального резерва, наличием дистрофических процессов в гранулезных клетках фолликулов, изменением состава фолликулярной жидкости, повышенным апоптотическим индексом клеток гранулезы, дегенерацией ооцитов [7; 70; 71; 72; 73]. Несмотря на совершенствование хирургических подходов в лечении эндометриоза яичников, риск снижения овариального резерва после оперативного вмешательства остается высоким. Кроме этого, отсутствие ранней диагностики и часто бессимптомное течение эндометриоза также лежит в основе снижения овариального резерва за счет влияния кисты на ткани яичника. Выявление факторов патологического воздействия на ткани яичника может способствовать развитию дополнительных подходов в терапии эндометриоза и профилактики снижения овариального резерва. Определение овариального резерва до и после операции играет важную роль в сохранении и восстановлении репродуктивного здоровья женщин.

### **Цель исследования**

Повышение эффективности хирургического лечения женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников на основании изучения состояния овариального резерва с использованием молекулярно-

генетических маркеров и ранжированного подхода к оперативному вмешательству с целью сохранения репродуктивной функции.

### **Задачи исследования**

1. Оценить состояние овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников до и после хирургического лечения.

2. Провести сравнительный анализ экспрессии мкРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия у пациенток с эндометриоидными кистами яичников и выявить взаимосвязь между состоянием овариального резерва и экспрессией мкРНК в тканях эндометрия у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников.

3. Провести транскриптомный анализ экспрессии генов, выделенных в тканях эутопического и эктопического эндометрия и оценить взаимосвязь дифференциально экспрессирующихся генов и мкРНК с патогенетическими механизмами снижения овариального резерва при эндометриоидных кистах яичников.

4. Изучить состояние репродуктивной функции у женщин с эндометриоидными кистами яичников до и после оперативного лечения.

5. Составить модель прогноза снижения овариального резерва и разработать алгоритм индивидуальной тактики лечения женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников в зависимости от состояния овариального резерва, степени распространения эндометриоза и предшествовавшего оперативного вмешательства.

### **Научная новизна**

Впервые была проведена сравнительная оценка экспрессии мкРНК и мРНК в тканях эндометриоидных кист яичника относительно тканей эутопического эндометрия как при нормальном, так и при низком овариальном резерве. Был выполнен биоинформационный анализ транскриптомных данных, на основании

которого были установлены внутриклеточные сигнальные пути и процессы, участвующие в патогенезе эндометриоза и развитии низкого овариального резерва при эндометриоидных кистах яичников.

При различных состояниях овариального резерва у женщин с эндометриоидными кистами яичников наблюдаются существенные изменения экспрессии генов и мкРНК. Были выявлены отличия в экспрессии ряда мкРНК в тканях эутопического эндометрия при различном состоянии овариального резерва, которые могут быть использованы в качестве маркеров низкого овариального резерва при эндометриозе на дохирургическом этапе. Дисбаланс в экспрессии мкРНК, обеспечивающих регуляцию таких процессов, как клеточный цикл, репарация ДНК, воспаление, окислительный стресс, приводит к формированию эндометриоидной кистой патологического окружения, способствующего нарушению функции яичников и снижению овариального резерва. Выделенные с помощью биоинформационного анализа молекулярные эффекторы указанных процессов возможно рассматривать в качестве перспективных мишеней для таргетной терапии эндометриоза с учетом состояния овариального резерва.

### **Практическая значимость**

Произведена оценка овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников до и после операции. На основании клиничко – анамнестических и лабораторных данных составлена модель прогноза снижения овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников на этапе до хирургического лечения.

Оценена частота возникновения низкого овариального резерва в послеоперационном периоде у женщин репродуктивного возраста, перенесших оперативное вмешательство по поводу эндометриоидных кист яичников. Изучено влияние хирургического вмешательства на яичниках на овариальный резерв.

Произведена оценка репродуктивных исходов у пациенток, перенесших оперативное вмешательство на яичниках по поводу эндометриодных кист.

Составлен прогноз снижения овариального резерва в послеоперационном периоде.

### **Методология и методы исследования**

Проведено проспективное исследование, в которое было включено 136 женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Данное исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (директор – академик РАН, профессор, д.м.н. Г.Т. Сухих). Все 136 пациенток поступили в отделение гинекологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – академик РАН, профессор, д.м.н. Л.В. Адамян) для оперативного лечения. Пациентки были разделены на две группы в зависимости от состояния овариального резерва (1 группа - пациентки с исходно нормальным овариальным резервом, 2 группа - пациентки с исходно низким овариальным резервом).

В работе использованы следующие методы диагностики: данные анамнеза, объективный осмотр, гинекологический осмотр, общее лабораторное обследование, двухмерное ультразвуковое исследование, диагностическая и лечебная гистероскопия и лапароскопия, морфологическое исследование.

У всех 136 пациенток с ЭКЯ изучалось состояние овариального резерва (ОР). Оценка состояния ОР проводилась на этапе до операции и через 3 и 6 месяцев после операции. Для этого оценивался уровень АМГ и ФСГ в сыворотке крови, при УЗИ подсчитывалось количество антральных фолликулов в яичниках. Проводилось сопоставление состояния ОР с клиническими данными, интраоперационным обследованием и объемом выполненной операции.

Диагноз ЭКЯ был подтвержден во время гистологического исследования. Патоморфологическое исследование выполнялось в 1-ом патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – профессор, д.м.н. А.И. Щеголев).

Часть материала (капсула ЭКЯ и эндометрий) были отобраны для исследования экспрессии уровней микроРНК, исследование выполнялось в

лаборатории молекулярной патофизиологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – к.х.н. М.Ю. Бобров). Материал был разделен также на две группы (1 группа - пациентки с исходно нормальным ОР, 2 группа - пациентки с исходно низким ОР). В каждой группе исследовалась экспрессия микроРНК в ткани эктопического эндометрия (ЭКЯ) и в ткани эутопического эндометрия (эндометрий из полости матки). Суммарную РНК выделяли из 20-40 мг гистологического материала набором miRNeasy Micro Kit (Qiagen) с последующей дополнительной очисткой суммарной РНК и обогащением фракцией мкРНК набором RNeasyMinElute Cleanup Kit (Qiagen) с использованием автоматической станции QIAcube (Qiagen) в соответствии с протоколами фирмы-производителя. Концентрацию РНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen™). Качество образца суммарной РНК проверяли методом капиллярного электрофореза с использованием набора RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) в биоанализаторе Agilent Bioanalyzer 2100. В дальнейшее исследование брали образцы суммарной РНК с соотношением молярных концентраций рибосомальных РНК (28S и 18S), равным 1,5-1,8. С помощью биоинформационного анализа проводилось выделение генов-мишеней дифференциально экспрессированных мкРНК.

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

**1.** Снижение овариального резерва отмечается у 49% женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников. Статистически достоверными факторами низкого овариального резерва до операции являются: возраст пациенток старше 32 лет, ранее перенесенные операции на яичниках, рецидив эндометриоидной кисты, двустороннее поражение яичников эндометриоидными кистами, размеры эндометриоидных кист более 6 см и III – IV стадия распространения эндометриоза. В послеоперационном периоде статистически достоверными факторами, влияющими на снижение овариального резерва, являются: двусторонняя резекция яичников, диаметр кист более 4-х см, а также исходный уровень АМГ 2 нг/мл и ниже.

2. У пациенток с эндометриоидными кистами яичников наблюдается разнонаправленная экспрессия микроРНК в тканях эндометриоидной кисты по сравнению с эутопическим эндометрием. Наиболее выраженные различия выявлены при исходно нормальном овариальном резерве. При низком овариальном резерве отмечена экспрессия трех микроРНК (hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-615-3p) не характерных для нормального овариального резерва. По данным биоинформационного анализа дифференциально экспрессированные мкРНК и их гены-мишени принимают участие в регуляции клеточного цикла, дифференцировки и процессов воспаления.

3. Установлена дифференциальная экспрессия микроРНК в тканях одинаковой локализации при разном типе овариального резерва, которая имеет разнонаправленный характер. Методом секвенирования и ПЦР валидацией выделены микроРНК (hsa-miR-1-3p, -143-3p, -381-3p) с повышенной экспрессией в эндометрии, характерные только для низкого овариального резерва.

4. Снижение функции яичника связано с изменением экспрессии генов в тканях эктопического и эутопического эндометрия: низкий овариальный резерв характеризуется значительным снижением числа дифференциально экспрессированных генов. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК и их гены-мишени формируют пути внутриклеточной сигнализации, регулирующие процессы репарации ДНК, клеточного деления, тканевого ремоделинга, клеточной адгезии, воспаления и окислительного стресса. Различная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при нормальном и низком овариальном резерве коррелирует с клиническими проявлениями и длительностью заболевания, стадией распространения эндометриоза, низким процентом реализации репродуктивной функции и низкой эффективностью вспомогательных репродуктивных технологий.

#### **Личный вклад автора**

Автор принимала непосредственное участие в определении тематики научной работы и формировании ее методологической структуры. Автором была

осуществлена разработка целей и задач, обобщение материала, подбор пациенток, сбор анамнеза, проводила забор биологических материалов для исследования; самостоятельно выполняла анализ данных, полученных при исследовании состояния овариального резерва, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка полученных данных, публикация основных результатов исследования. Автор участвовала в подготовке гистологических материалов для секвенирования мкРНК, интерпритации полученных при секвенировании и биоинформационном анализе результатов. Принимала личное участие в обследовании, оперативном лечении больных, в их послеоперационном ведении.

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

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальностей 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 3, 4, 5 паспорта акушерства и гинекологии.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Достоверность выполненного исследования определяется достаточным количеством пациенток, включенных в исследование (136 пациенток), применением современных методов обследования и статистической обработки данных.

### **Апробация работы**

Апробация диссертации была проведена на межклинической конференции (3.09.2018 г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (25 марта 2019 г., протокол № 5).

Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: XI, XII, XIII Международных конгрессах по

репродуктивной медицине (Москва 2017, 2018, 2019), XXIII и XXIV Всероссийских конгрессах с международным участием «Амбулаторно – поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2017 и 2018), XXX, XXXI и XXXII Международных конгрессах с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2017, 2018 и 2019), XVIII и XIX Всероссийских научно – образовательных форумах «Мать и дитя» (Москва 2017 и 2018), Российской научно – практической конференции «Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте: проблемы и решения» (Москва, 2017), I Национальном конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2019).

### **Внедрение в практику**

Полученные научные и практические данные внедрены в работу гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦАГиП им академика В.И. Кулакова» МЗ РФ.

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 – в рецензируемых научных изданиях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 164 страницах и состоит из введения, 4 глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, результатам собственных наблюдений, обсуждению полученных результатов, а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 26 рисунками. Библиографический указатель содержит 243 источника, из них 39 отечественных и 204 зарубежных.

# **Глава 1. Современный взгляд на овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников (Обзор литературы)**

Эндометриоидные кисты яичников являются наиболее часто встречающейся формой эндометриоза, на которую приходится 17 – 44% всех пациентов с эндометриозом [8]. По данным ряда ученых [9] в 70% случаев эндометриоидные гетеротопии локализуются на яичниках. Поражение яичников эндометриозом встречается у 12% женщин, подвергшихся оперативному лечению по поводу гинекологических заболеваний и у 15,4% больных, оперированных по поводу доброкачественных опухолей и опухолевидных образований яичников [9].

## **1.1. История изучения патофизиологии эндометриоидных кист яичников**

Ранние описания эндометриомы яичников как «гематомы яичника» или «шоколадных кист» относятся к концу XIX века. Ещё Carl von Rokitansky в 1855 – 1860 годах в своей работе «Пособие по Патологической Анатомии» описывал случаи эндометриоидных кист, указывая, что в них имеются железистые структуры, характерные для эндометрия. Но при описании эндометриом он использовал свой собственный термин и называл их цистосаркомы. [10]. Первое однозначное описание (с четкой иллюстрацией) наличия ткани, подобной эндометрию в яичнике было изложено в статье, опубликованной в 1899 году W.W. Russel [11]. При микроскопическом исследовании стенки кисты им были обнаружены железы, подобные железам эндометрия в матке, эпителиальная выстилка которых имела свою собственную мембрану и частично окруженных пучками гладкомышечных клеток. Согласно тенденциям того времени, W.W. Russel предполагал, что развитие подобных кист происходит при патологическом развитии Мюллерова протока [12] Несколько случаев наличия кисты яичника,

строение стенки которой было схоже с эндометрием было описано в ряде работ Н. В. Semmelink и De Josselin de Jong в 1905 г., где считалось происхождение ЭКЯ из Вольфова протока [13]. В 1921 году J. A. Sampson в своей работе «Перфоративные геморрагические «шоколадные» кисты яичника» предложил имплантационную теорию развития эндометриоидных кист, считая, что эпителий, выстилающий стенку кисты имеет происхождение либо из эндометрия матки, либо из эпителия трубного происхождения. J.A. Sampson впервые показал, что эпителий стенки эндометриоидной кисты претерпевает те же изменения в течение менструального цикла, что и эпителий эутопического эндометрия (децидуализацию, десквамацию) [14]. Он считал, что яичник является «промежуточным хозяином» эктопического эндометрия, предполагая, что разрывы эндометриоидных кист являются причиной перитонеального эндометриоза [15]. В дальнейшем несколькими авторами был предложен противоположный механизм развития эндометриоидных кист яичников. О.Н. Schwarz и R. Crossen, делая надрезы на поверхности небольших кист яичников, показали, что очаги эндометриоза, попадая на белочную оболочку яичника, втягивают ее во внутрь [16]. Наконец, в 1957 году Р.Е. Hughesdon продемонстрировал на серии гистологических срезов из 27 яичников с шоколадной кистой *in situ*, что в 90% случаев стенка кисты состояла из дезорганизованного, растянутого коркового вещества яичников с признаками метаплазии. [17]. Им было предложено, что инвагинация коркового слоя яичника с активными имплантами эндометриальной ткани на поверхности и кровотечение из этих имплантов приводит к образованию псевдокисты [17]. Эти наблюдения подтверждены в 1994 году с помощью овариоскопии, проведенной I.A. Brosens и др [18], которые установили, что в большинстве случаев ЭКЯ образуются при инвагинации коркового слоя яичника и что активные имплантаты расположены в месте инвагинации. Ими было доказано отсутствие истинной анатомической капсулы ЭКЯ. Внутренняя выстилка ЭКЯ представлена эндометриальным эпителием со стромой или без нее, корковым веществом яичника с фолликулами или без, фиброзной тканью, макрофагами. J. Donnez и соавт [19] в своих работах доказали, что мезотелий, покрывающий поверхность яичника может врастать в корковый

слой, отодвигая фолликулы в глубь ткани яичника. Формирование кисты с кровоизлиянием происходит вторично после метаплазии инвагинированного эпителия. [19]. Наконец, F. Nezhat и соавт., предположили, что крупные ЭКЯ могут развиваться в результате вторичного вовлечения функциональных кист яичников в эндометриальные имплантаты, расположенные на поверхности яичника [20].

Таким образом были предложены несколько теорий происхождения эндометриоидных кист: метаплазии и инвагинации мезотелия, инвагинации коркового слоя с поверхностными имплантами, инвазии эндометриоидных гетеротопий в желтое тело. Однако окончательный патогенетический механизм формирования ЭКЯ не установлен.

## **1.2. Классификация эндометриоидных кист яичников**

Первую классификацию эндометриоза привел J.A Sampson в 1921 г., когда он описал геморрагические кисты и отметил наличие сопутствующих спаек [14]. Следующие классификации основывались на гистологических критериях, анатомических находках. При рассмотрении эндометриоза как опухолевого процесса, его классификации имели сходство с классификациями злокачественного процесса. J.M. Huffman в 1951 году выделил четыре группы пациенток с эндометриозом, связывая распространенность процесса с необходимостью проведения консервативной терапии у женщин, планирующих беременность [14]. В 70-х годах XX века учеными были предприняты попытки классифицировать заболевание в связи с его распространенностью и клиническими проявлениями. В 1977 году А.Н. Стрижаковым была предложена классификация, основанная на размерах очагов эндометриоза [21; 22]. В данной классификации эндометриоз яичников разделен на четыре степени:

I степень – мелкие точечные очаги эндометриоза на поверхности яичников и на брюшине прямокишечно – маточного углубления;

II степень – односторонняя эндометриоидная киста диаметром не более 5 – 6 см, мелкие очаги эндометриоза на брюшине малого таза, спаечный процесс в области придатков;

III степень – эндометриоидные кисты обоих яичников диаметром более 5 – 6 см, очаги эндометриоза на серозном покрове матки, маточных труб, брюшине малого таза, выраженный спаечный процесс;

IV степень – двусторонние кисты больших размеров с переходом на соседние органы.

Классификацией эндометриоза, получившей широкое международное распространение, стала классификация, предложенная Американским обществом фертильности (AFS) в 1979 году и пересмотренная в 1985 году (Таблица 1). В данной классификации эндометриоз был разделен на четыре стадии в зависимости от числа баллов: стадия I – от 1 до 5 баллов, стадия II - от 6 до 15 баллов, стадия III – от 16 до 40 баллов и стадия IV – свыше 40 баллов [23; 24].

Таблица 1 - Пересмотренная классификация эндометриоза Американского общества фертильности 1985 года

Поражение и локализация		Детализация поражения, баллы			
		< 1 см	1 – 3 см	> 3 см	
Брюшина	Поверхностный	1	2	4	
	Глубокий	2	4	6	
Яичники	Правый	Поверхностный	1	2	4
		Глубокий	4	16	20
	Левый	Поверхностный	1	2	4
		Глубокий	4	16	20
Облитерация позадматочного пространства		Частичная		Полная	
		4		40	
Спайки		<1/3 запаяно	1/3 – 2/3 запаяно	>2/3 запаяно	

Продолжение таблицы 1

Яичники	Правый	Пленчатые	1	2	4
		Плотные	4	8	16
	Левый	Пленчатые	1	2	4
		Плотные	4	8	16
Трубы	Правая	Пленчатые	1	2	4
		Плотные	4*	8*	16
	Левая	Пленчатые	1	2	4
		Плотные	4*	8*	16
Примечание: * полностью запаянный фимбриальный отдел трубы - оценивать как 16 баллов. Стадия I – 1-5, II – 6-15, III – 16-40, стадия IV - >40					

Наиболее полной отечественной классификацией эндометриоза является классификация, предложенная академиком Л.В. Адамян в 1993 году и переработанная в 1998 году. В основе данной классификации лежат эндометриозные поражения и патологические изменения в органах с учетом патогенеза различных форм заболевания [25].

Классификация эндометриозных кист яичников (под редакцией Л.В. Адамян, В.И. Кулакова) [25]:

- стадия I – мелкие точечные эндометриозные образования на поверхности яичников, брюшине прямокишечно – маточного пространства без образования кистозных полостей;
- стадия II – эндометриозная киста одного яичника размером не более 5 – 6 см с мелкими эндометриозными включениями на брюшине малого таза. Незначительный спаечный процесс в области придатков матки без вовлечения кишечника;
- стадия III – эндометриозные кисты обоих яичников (диаметр кисты одного яичника более 5 – 6 см и небольшая эндометриоза другого). Эндометриозные гетеротопии небольшого размера на париетальной брюшине

малого таза. Выраженный спаечный процесс в области придатков матки матки с частичным вовлечением кишечника;

- стадия IV – двусторонние эндометриозные кисты яичников больших размеров (более 6 см) с переходом патологического процесса на соседние органы – мочевого пузыря, прямую и сигмовидную кишку. Распространенный спаечный процесс.

В 2000-е годы появилась необходимость создания классификации эндометриозных кист яичников, отражающей репродуктивный потенциал женщин, перенесших оперативное вмешательство. В 2009 году G. Adamson и др. [26] представили классификацию, учитывающую факторы, которые приводят к эндометриоз-ассоциированному бесплодию, получившую название Индекс фертильности при эндометриозе (endometriosis fertility index - EFI). [26] Необходимым условием для расчета индекса фертильности является лапароскопически подтвержденный эндометриоз с заключением хирурга, включающее оценку функции главных анатомических структур, участвующих в репродукции. Разработаны специальные таблицы для интраоперационного определения степени нарушения функции органов малого таза (Рисунок 1, 2) [26; 27].

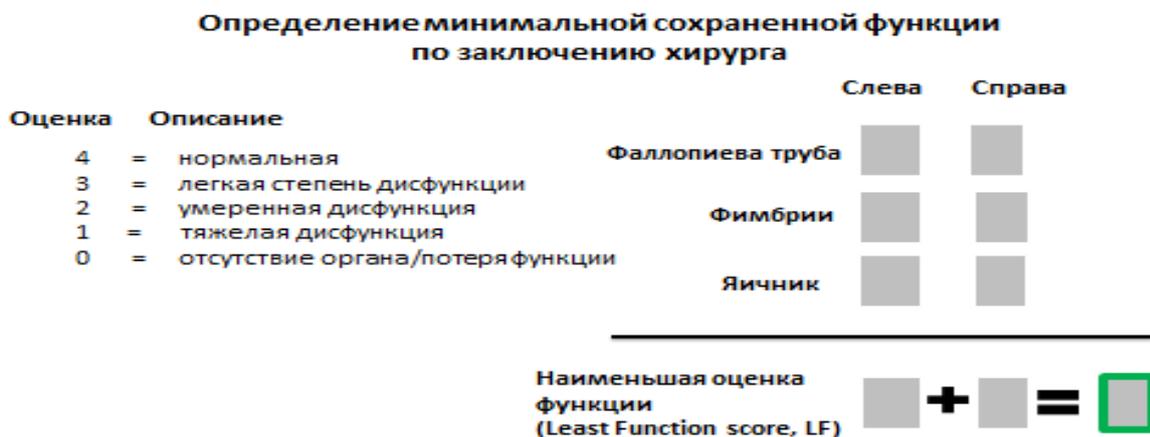


Рисунок 1 - Оценка функции яичников и маточных труб.

### Расчет индекса фертильности при эндометриозе

Анамнестические данные			Данные хирургического вмешательства		
Фактор	Определение	Баллы	Фактор	Определение	Баллы
Возраст	≤ 35 лет От 36 до 39 лет ≥ 40 лет	2 1 0	LF-оценка 	От 7 до 8 От 4 до 6 От 1 до 3	3 2 0
Длительность периода бесплодия	≤ 3 лет Более 3 лет	2 0	AFS-классификация Оценка эндометриоза	Менее 16 ≥ 16	1 0
Предыдущие беременности	Наличие Отсутствие	1 0	AFS-классификация Полная оценка	Менее 71 ≥ 71	1 0
Итог анамнестических данных: 			Итог операционных данных: 		

**Индекс фертильности** =  + 

Рисунок 2 - Расчет индекса фертильности.

Индекс фертильности варьирует от 0 до 10 (10 – лучший прогноз). Существует рекомендуемая номограмма, связанная с оценкой индекса фертильности, помогающая сориентироваться в прогнозе и частоте наступления беременности в случае наличия эндометриоза [27] (Рисунок 3).

### Частота наступления беременности при определенном индексе фертильности

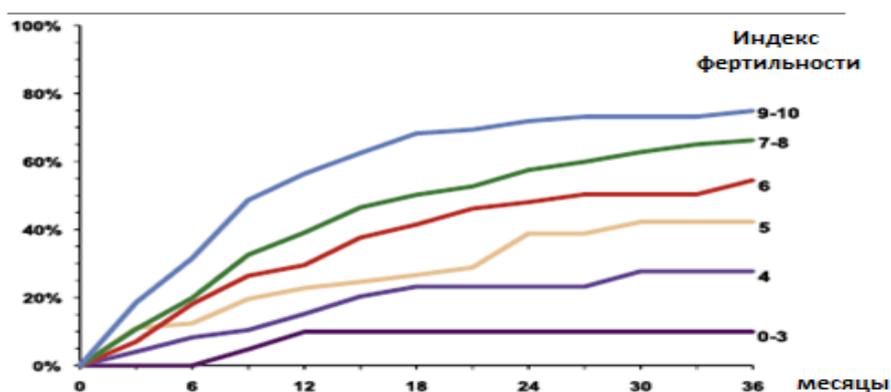


Рисунок 3. - Определение вероятности наступления беременности.

Следует отметить, что данная классификация также не совершенна и имеет недостатки. При ее использовании не производится оценка овариального резерва и не учитывается состояние эндометрия, что является принципиальным при планировании беременности. До разработки универсальной классификации ЭКЯ, учитывающей стадию распространения, размеры кист, билатеральность поражения, клиническую симптоматику, состояние овариального резерва, прогноз возможности сохранения репродуктивной функции и наступления беременности как спонтанной, так и с применением программ ВРТ, эксперты Международной ассоциации Эндометриоза (World Endometriosis Society) предлагают хирургам использовать комплекс классификаций [28]. В Российской Федерации наиболее распространенной является классификация ЭКЯ, предложенная Л.В. Адамян. (1993, 1998 гг.) [9; 25].

### **1.3. Клиническая картина эндометриoidных кист яичников**

В соответствии с одним из положений Глобального Консенсуса по современному ведению эндометриоза (Consensus on current management of endometriosis) 2013 года в рамках рутинного обследования пациенток врачам следует задавать два вопроса – «Беспокоит ли тазовая боль?» и «Бывали ли периоды безуспешных попыток забеременеть?». При наличии положительного ответа хотя бы на один вопрос, следует продолжить диагностический поиск [128]. Наиболее важным, а иногда единственным, клиническим симптомом ЭКЯ является боль различной интенсивности, локализующаяся в нижних отделах живота и в области поясницы, усиливающаяся накануне менструации, болезненные менструации, боли при половой жизни [29; 127]. По данным ряда исследователей, клинические проявления ЭКЯ зависят от стадии их распространения, объема кист, вовлеченности в процесс соседних анатомических структур, спаечного процесса [30; 31; 32]. При поверхностных очагах эндометриоза на яичниках, небольшом диаметре кист симптоматика может отсутствовать. Однако, по мнению Л.В. Адамян (1998), даже минимально распространенные формы эндометриоза на брюшине, могут вызвать нестерпимые боли, приводящие к нетрудоспособности, но

в то же время, эндометриоидные кисты больших размеров, могут протекать бессимптомно [9; 35]. В исследованиях отечественных и зарубежных ученых показано, что боль при ЭКЯ имеет меньшую интенсивность по сравнению с другими локализациями эндометриоидных гетеротопий. Болевой симптом при ЭКЯ может возникать только при микроперфорации кист, вызывая так называемый «химический» перитонит [127; 33; 34]. Так, M.G. Porroa, P.R. Koninckx [34], установили, что наличие хронической тазовой боли, дисменореи и интенсивность болевого синдрома не зависели от размера ЭКЯ и стадии распространения процесса, а имели достоверную корреляцию с наличием перитонеальных спаек и эндометриоидными кистами, образующими спайки вокруг яичников. Л.В. Адамян, А.С. Овакимян [35] изучая хроническую тазовую боль при различных формах эндометриоза, выявили, что ЭКЯ с одинаковой частотой встречаются как в группах женщин с отсутствием болевого синдрома, так и с наличием болевого синдрома. При этом кисты большого диаметра (более 5 см) встречались только в группах пациентов, предъявляющих жалобы на боли. Учитывая отсутствие в большинстве случаев выраженной клинической симптоматики, ЭКЯ могут существовать достаточно длительное время. Единственным поводом для обращения за медицинской помощью таких пациенток могут послужить неудачные попытки забеременеть. Процент бесплодия у женщин с ЭКЯ варьирует от 25 до 40% [9; 6; 36]. Бесплодие может быть ассоциировано не только с ЭКЯ больших размеров, но и встречаться у пациенток с 1 – 2 ст распространения процесса.

Основным неинвазивным методом диагностики ЭКЯ, в настоящее время, является ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза, точность его составляет 97% и более [38]. Односторонние кисты по данным УЗИ выявляются чаще, чем двусторонние (81% и 19% соответственно). В большинстве случаев кисты локализуются сбоку и сзади от матки, их размеры колеблются в широких пределах (от 0,8 до 12 см), однако в 90% случаев их диаметр составляет 2,5 – 7 см [37; 127]. Выделяют следующие признаки ЭКЯ при ультразвуковом обследовании: 1) мелкоочечная внутренняя структура; 2) округлая форма образования; 3) утолщенная эхоплотная капсула кисты; 4) обнаружение вблизи кист небольших

размеров ткани «неизмененного» яичника; 5) отсутствие вариаций внутренней эхоструктуры при динамическом обследовании в различные фазы менструального цикла [22]. Ведущим ультразвуковым маркером ЭКЯ, по мнению А.Н. Стрижакова, А.И. Давыдова, является обнаружение мелкодисперсной эхопозитивной взвеси на фоне повышенного уровня звукопроводимости [38]. При 3D сканировании идентифицируются следующие специфичные для ЭКЯ: «двойной» гиперэхогенный контур по периферии образования, мелкодисперсное внутреннее содержимое при ротации реконструированного изображения приобретает характерный вид «матового» стекла. Магнитно – резонансная томография (МРТ) также занимает важную роль в диагностике ЭКЯ. Чувствительность, специфичность и точность МРТ – диагностики ЭКЯ составляет не менее 98% [38; 127]. Характерной особенностью ЭКЯ при МРТ является инверсия МР – сигнала на T1 – и T2 – взвешенных изображениях; достаточно гомогенный высокий интенсивный МР – сигнал на T1 – взвешенном изображении и гипоинтенсивный или изоинтенсивный МР – сигнал на T2 – взвешенном изображении; гомогенный характер повышения или понижения сигнала с эффектом его равномерного «затенения», с кольцом гемосидерина по периферии [39; 40; 127]. Для точной постановки диагноза ЭКЯ, уточнения размеров кист, вовлечения контрлатерального яичника, распространенности эндометриоза, оценки состояния соседних органов, в том числе маточных труб, наличия спаечного процесса в малом тазу, а также гистологической верификации, необходима лапароскопия и экцизия (цистэктомия) ЭКЯ. Согласно Глобальному Консенсусу 2013 года, лапароскопия является «золотым стандартом» диагностики и лечения ЭКЯ [128]. Учитывая, что в настоящее время появляется большое количество доказательств о том, что хирургическое лечение ЭКЯ способствует снижению овариального резерва (ОР), нарушению фертильности, очень важно проводить оценку функционального состояния яичников перед проведением лапароскопии.

#### **1.4. Понятие «овариальный резерв»**

Несмотря на многочисленные исследования, точные механизмы, посредством которых эндометриоз влияет на фертильность до конца не выяснены [41; 42]. В настоящее время бесплодие у больных эндометриозными кистами яичников, наряду с другими значимыми причинами, связывают с сокращением овариального резерва яичников [43].

Под овариальным резервом понимают функциональный резерв яичника, который определяет способность последнего к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой и адекватному ответу на овариальную стимуляцию [44; 45]. ОР отражает количество находящихся в яичниках фолликулов (примордиальный пул и растущие фолликулы) и зависит от физиологических и патологических факторов [7].

#### **1.5. Факторы снижения овариального резерва при ЭКЯ**

Одним из основных естественных факторов, который приводит к снижению ОР, является возраст женщины [7; 46]. Фолликулогенез – процесс формирования примордиального фолликула вокруг ооцита в диплотене профазы I мейоза и дальнейший многостадийный процесс развития, роста и созревания ооцита и фолликула (от примордиального до предовуляторного) [47]. Фолликулогенез в яичниках человека развивается от антенатального периода до постменопаузы, когда фолликулы исчезают, поскольку заканчивается их пул [47]. Отмечено, что при нормально протекающей беременности уже к 20-й неделе у эмбриона создается пул примордиальных фолликулов в количестве 4 – 7 млн [47; 48]. К моменту рождения в корковом слое яичника содержится около 300 – 400 тыс. первичных фолликулов. К моменту полового созревания в яичниках остается около 200 тыс. первичных фолликулов. При наступлении полового созревания организма в рост и развитие вступает определенное количество ооцитов, заключенных в примордиальные фолликулы [47]. В течение всего периода половой зрелости женщины полностью созревает лишь 400 – 500 фолликулов [49]. С каждым менструальным циклом общее количество фолликулов уменьшается. Проведенные

в последние годы исследования показали, что скорость исчезновения фолликулов удваивается, когда примордиальный пул сокращается до 25000 фолликулов, что в норме соответствует возрасту 37,5 лет. Этот возраст определяется как критический, после которого овариальный резерв резко снижается. [50; 51; 52]. Отечественными учеными (Л.В. Адамян, Л.Ф. Курило) [53] выявлена закономерность между количеством примордиальных фолликулов в 1 поле зрения и возрастом женщины. Ими установлено, что в возрасте 18 – 35 лет число примордиальных фолликулов составило  $7,5 \pm 2,5$ , в возрасте 36 – 55 лет –  $1 \pm 1$  ( $\times 240$ ) [53]. Рядом ученых была предложена теория «старения» окружающей среды, а не яйцеклетки [54]. Данная концепция предполагает, что основную роль в старении фолликулярного аппарата яичников играют изменения, происходящие с возрастом в клетках гранулезы, что выражается в снижении в них продукции эстрадиола и ингибина В [50]. Предполагается, что ооциты в первичных фолликулах не «стареют». Только начав дифференцировку и созревание, половые клетки приобретают риск «потери качества» за счет созревания в измененной околоооцитарной среде [50; 55].

Принадлежность к определенной этнической группе также может влиять на ОР. В исследованиях С. Iglesias, К. Jayaprakasan и др. было установлено, что женщины из Индии, Юго-Восточной Азии, стран Карибского бассейна, Китая и Латинской Америки имели более низкий ОР, по сравнению с женщинами того же возраста европейской расы и Кавказа [7; 56; 57; 58].

К патологическим факторам, приводящим к снижению овариального резерва, относятся: эндометриозные кисты яичников, инфекции органов малого таза (в частности, хламидиоз, генитальный туберкулез) [7; 59], хирургические вмешательства на яичниках, химиотерапия и радиационное облучение органов малого таза [7; 60], избыточная масса тела [61] и курение [62]. Интоксикации различными химическими веществами, которые используются в промышленности, сельском хозяйстве в качестве пестицидов, гербицидов, растворителей, отходы промышленности (тяжелые металлы и продукты химического синтеза), также могут приводить к снижению ОР [7; 63; 64].

### **1.6. Влияние эндометриоидных кист яичников на овариальный резерв**

Существует несколько механизмов, которые приводят к нарушению овариального резерва при ЭКЯ. Еще в 1957 году Р.Е. Hugheson и др. было описано, что в ткани коркового слоя яичника, располагающейся непосредственно возле ЭКЯ, имеются признаки метаплазии и дезорганизации. Барьер, отделяющий ткань яичника от кисты состоит из фиброзной ткани [7; 65]. Недавние исследования показали, что эндометриоидная жидкость содержит ряд токсических веществ, таких как провоспалительные цитокины и активные формы кислорода [7; 66; 67]. Данные вещества вызывают фиброз в окружающих кисту тканях яичника и снижение стромальных клеток в корковом слое яичника. В последствие фиброз совместно с активными формами кислорода приводит к снижению ангиогенеза, уменьшению плотности капилляров в тканях яичника [7; 68]. Снижение васкуляризации в корковом слое яичника при ЭКЯ может привести к ухудшению кровоснабжения фолликулов и их потере.

В корковом слое яичников при эндометриозе происходит ускоренный рост фолликулов с последующим истощением и снижением их количества. Эта теория «выгорания» была предложена М. Dolmas и др. в 2007 г. [69]. Данная теория была подтверждена в исследованиях М. Kitajima и соавторов в 2014 году [7; 70]. Ими было выявлено значительное увеличение процентного содержания первичных фолликулов в корковом слое яичника с ЭКЯ по сравнению с интактным яичником. В данных исследованиях было установлено, что в яичниках с эндометриоидными кистами может быть активировано раннее развитие фолликулов, увеличение количества атрезированных фолликулов, нарушение регуляция отбора фолликулов, снижение пула ранних фолликулов, в результате чего исчерпывается пул примордиальных фолликулов [7; 69; 70].

Также, группой исследователей было высказано предположение, что воспаление и фиброз со сниженной васкуляризацией и повышением оксидативного стресса, которые наблюдаются в корковом слое яичников при эндометриоидных кистах, приводят к нарушению фолликулогенеза. В работах Л.В. Адамян, (2005, 2009 гг.), И.Ю. Шуляк, Л.Ф. Курило (2009, 2010 гг.) было показано нарушение

фолликулогенеза яичников женщин с эндометриозом, характеризующееся снижением общего числа фолликулов всех стадий развития [7]. У больных эндометриоидными кистами яичников выявлено резкое снижение числа примордиальных фолликулов, растущих фолликулов. При этом степень уменьшения числа фолликулов в яичниках женщин с эндометриозом зависит от стадии распространения патологического процесса, возраста пациентки [7; 71; 72].

В качестве возможных причин бесплодия при эндометриоидных кистах яичников рассматриваются дистрофические процессы в гранулезных клетках фолликулов, изменение состава фолликулярной жидкости, повышенный апоптотический индекс клеток гранулезы, дегенерация ооцитов [7; 73].

Эндометриоз связан с воспалительными изменениями в фолликулярной жидкости [7; 74; 79]. Эндометриоидные клетки секретируют исключительно высокие уровни цитокинов и хемокинов. Цитокины, такие как интерлейкин (ИЛ)-1 $\beta$ , ИЛ-6 и фактора некроза опухоли (ФНО) и хемокины, такие как ИЛ-8, моноцитарный хемоаттрактантный протеин (MCP)-1, могут вызвать активацию клеток гранулезы и преждевременное развитие фолликулов и последующему снижению их количества [7; 74]. Прямо или косвенно эти вещества могут приводить к активации в фолликулярных клетках каскада сигнальных молекул - циклический аденозинмонофосфат/протеинкиназа (сAMP/РКА), тирозинкиназа/сигнал-преобразователя и активатора транскрипции (JAK/STAT), ядерный фактор карра В (NF $\kappa$ B), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и внутриклеточного кальция, что приводит к преждевременной активации роста фолликулов [69]. Воздействие эндометриоидной кисты на окружающую ее ткань яичника представлено на Рисунке 4.

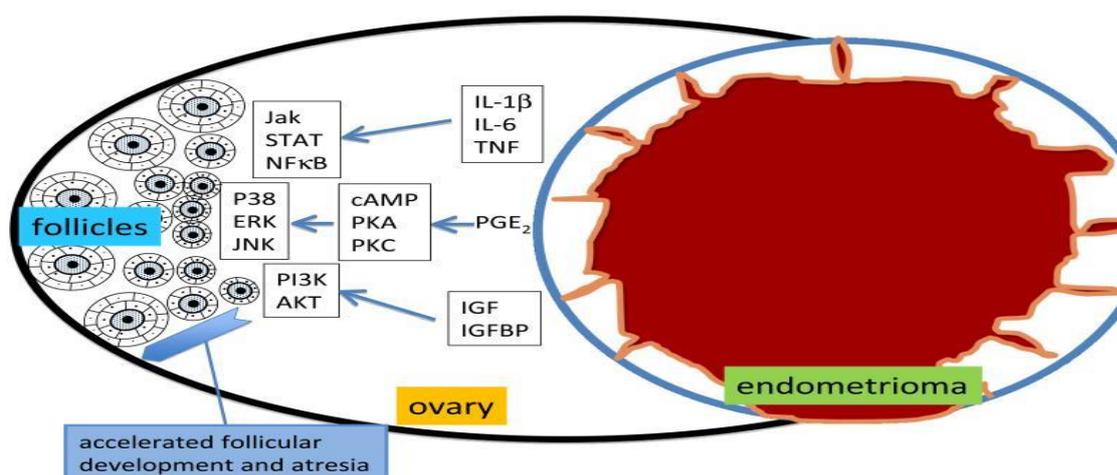


Рисунок 4 - Схематическое представление воздействия эндометриоидной кисты на макро – и микроокружение яичника.

В эндометриоидной ткани в большом количестве производится простагландин E2 (PGE<sub>2</sub>), который через аденозинмонофосфат/протеинкиназа-а (сАМР/РКА) путь активирует митогенные протеинкиназы (МАРКs), протеин 38 (р38), в ряде типов клеток, включая клетки гранулезы и тека-клетки в фолликулах. Можно предположить, что PGE<sub>2</sub> и другие эйкозаноиды, образующихся в воспалительных среде, окружающей эндометриоидную кисту, могут влиять на скорость активации фолликулов и их атрезию [7; 75]. Работы Y. Choi и соавт., продемонстрировали значительное повышение уровня IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  у женщин с эндометриозом [76]. Ими было установлено, что внутрифолликулярное провоспалительное микроокружение у женщин с эндометриозом отрицательно коррелирует с качеством ооцитов и эмбрионов [7; 76].

Повышение статуса окислительного стресса в фолликулярной жидкости, появление активных форм кислорода способствует нарушению мейоза и хромосомной нестабильности, являясь триггером остановки развития ооцита [7; 77]. Большинство авторов отмечают более низкие результаты ВРТ у женщин с генитальным эндометриозом в сравнении с другими факторами бесплодия (трубно-перитонеальный, мужской и др.). M. Hull и соавт. [7; 78] отмечали, что у пациенток с эндометриозом яичников нарушаются процессы оплодотворения ооцитов и

дробления полученных эмбрионов *in vitro*. При этом авторы указывали на худшее качество ооцитов, снижение частоты их оплодотворения и последующего дробления эмбрионов, а также снижение частоты имплантации даже при «малых» формах наружного генитального эндометриоза [79]. По данным А. Pellicer и соавт. [80], исследование эмбрионов на ранних стадиях развития показало относительно низкое число бластомеров у эмбрионов от пациенток с эндометриозом по сравнению с контролем, а также повышение индекса эмбрионов, остановившихся в развитии в условиях оплодотворения и доимплантационного развития *in vitro*. В литературе имеются данные о низкой способности к имплантации эмбрионов у женщин с эндометриозом ассоциированным бесплодием [7; 79; 80; 81; 82; 152; 153]. Предполагают, что причиной неудач при лечении бесплодия с использованием репродуктивных технологий являются неполноценные яйцеклетки, развитие которых происходило в субоптимальных условиях [7]. Для развития ооцитов и эмбрионов большое значение имеет состав ооплазмы. Аномалии или дисфункции митохондрий в цитоплазме зрелых ооцитов могут оказывать неблагоприятное влияние на оплодотворение и развитие эмбриона [81; 82]. В работах Л.В. Адамян, Л.Ф. Курило, И.Ю. Шуляк и др. были обнаружены не только количественные, но и «качественные» нарушения фолликулогенеза у пациенток с эндометриозом яичников. Так, при гистологическом исследовании фрагментов яичников с эндометриоидными кистами было отмечено большое число фолликулов с различными признаками дегенерации (изменение формы и размытые границы фолликула, ооцита и его ядра, фолликулярных клеток; частично деконденсированный хроматин, локализованный по всему ядру; утолщение, расслоение, гиалиноз базальной мембраны фолликула; формирование межклеточных пространств; нечеткая граница между слоями ткани – теки внутренней и наружной; фолликулярная жидкость различной оптической плотности, неравномерно прокрашенная эозином; крупные вакуоли в ооплазме; дезорганизация клеток гранулезы; изменение ширины прозрачной оболочки) [7; 83]. В. Хи и его коллегами [79] было показано, что большее число ядер ооцитов у женщин с эндометриозом содержит децентрализованный хроматин и объемное

ядрышко. Этими же учеными отмечен большой процент аномальных митохондрий, содержащих малые или набухшие и нечеткие вакуоли, а также уменьшение их общего количества, что подтверждено меньшим количеством копий митохондриальной ДНК (мтДНК) в ооцитах у женщин с эндометриозом [84]. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что низкое содержание мтДНК конкретно отражает снижение качества ооцитов у женщин даже с минимальным или легким эндометриозом [84; 79]. Кроме того, Р. Goud и соавт. в своих исследованиях обнаружили затвердевание *zona pellucida* и повышенную потерю кортикальных гранул при эндометриозе, что, возможно, препятствует оплодотворению, растворению *zona pellucida* и способности эмбриона проходить инкубацию и имплантацию [84; 85; 86]. В нескольких исследованиях показано, что ЭКЯ могут отрицательно влиять на стероидогенез клеток гранулезы яичников, уменьшая экспрессию ароматазы P450, являющейся ключевым ферментом синтеза эстрогенов, и выработку 17 $\beta$ -эстрадиола [87; 88]. Эстрадиол имеет решающее значение для развития ооцита, фолликулов и образования компетентного ооцита, способного достичь стадии метафазы II и оплодотвориться [89]. В работах В.Ю. Смольниковой [90] подтверждено негативное влияние эндометриоза на оплодотворяемость ооцитов, дробление развившихся в результате оплодотворения эмбрионов и снижение интенсивности дробления эмбрионов. Этим же автором показано, что среднее количество перенесенных в полость матки эмбрионов с соответствующей дню культивирования интенсивностью дробления в 1,5 – 3 раза меньше у женщин с эндометриозом по сравнению с контрольной группой [90].

Молекулярно – биологические подходы позволили выявить генетические маркеры, указывающие на возможную предрасположенность к эндометриозу. Изучение полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков и метаболизма эстрогенов (цитохрома P450 и глутатион S-трансферазы) позволило обнаружить мутантные аллели этих генов (GSTM 1 0/0, GSTT 1 0/0) у больных эндометриозом в сочетании с медленной формой N-ацетилтрансферазы [7]. При обнаружении у женщин мутации гена эритроцитарной эстеразы (D\*7) или гена сывороточной эстеразы (D\*5) можно предполагать повышенную предрасположенность к

эндометриозу яичников в сочетании с эндометриозом брюшины и к образованию эндометриоидных кист яичников [7; 91; 92]. Таким образом экспрессия генов, приводящих к развитию эндометриоза, может влиять на фолликулообразование на ранних стадиях формирования яичника. Дефект фолликулогенеза, имеющий место в эмбриональном периоде, в последующем может проявиться как в образовании исходно низкого числа фолликулов, так и в нарушении функции фолликулярных клеток [7; 93].

Данные исследования подтверждают теорию о том, что эндометриоидные кисты яичников могут привести к повреждению яичников до хирургического вмешательства. При проведении оперативного лечения при ЭКЯ важным аспектом является изучение состояния овариального резерва до оперативного вмешательства. Это позволит оценить степень повреждения ткани яичников до операции, выработать индивидуальную тактику ведения женщин с ЭКЯ и восстановить репродуктивную функцию данных пациенток.

### **1.7. Критерии оценки овариального резерва**

Существуют следующие критерии, на основании которых можно оценить состояние овариального резерва:

- возраст женщины;
- концентрация фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), ингибина В, эстрадиола (Е2), антимюллерова гормона;
- ультразвуковые характеристики яичников: число антральных фолликулов, объем яичников, показатели внутрияичникового кровотока.

Проведенные в последние годы исследования показали, что скорость исчезновения фолликулов удваивается, когда примордиальный пул сокращается до 25000 фолликулов, что в норме соответствует возрасту 37,5 лет. Этот возраст считается критическим, после которого овариальный резерв резко снижается [7; 94; 95].

В качестве первого гормонального теста, определяющего ОР, было предложено измерение уровня ФСГ на 2 – 3-й день менструального цикла

(базальный уровень). Но в разных менструальных циклах уровень ФСГ может колебаться от высоких до низких значений. Это является настораживающим в отношении снижения овариального резерва пациентки, но не абсолютным маркером состояния функции яичников [7; 44]. В последующих исследованиях было выявлено, что ведущую роль в регулировании уровня ФСГ в начале менструального цикла играет ингибин В, специфический белок, по своей структуре сходный с трансформирующим фактором роста [7; 96]. Ингибин В представляет собой гетеродимерный гликопротеин, состоящий из двух субъединиц –  $\alpha$  и  $\beta$ , с молекулярной массой около 32 кД каждая. Этот белок вырабатывается клетками Сертоли яичника и играет важную роль в регуляции фолликулогенеза. Клетки гранулезы малых антральных фолликулов яичника вырабатывают высокие концентрации ингибина В, и именно это определяет базальный уровень ФСГ в начале менструального цикла [7; 97]. Выяснилось, что более низкий уровень ингибина В в начале менструального цикла отражает уменьшенную популяцию малых антральных фолликулов и вызывает более резкий рост концентрации ФСГ, что в итоге приводит к быстрому росту доминантного фолликула и к более ранней овуляции. Подобные механизмы имеют место при уменьшенном овариальном резерве [7; 97].

Важная роль в оценке овариального резерва принадлежит ультразвуковому исследованию. В настоящее время объем яичников определяют на 2 – 5-й день цикла и вычисляют на основании трех измерений, сделанных в двух перпендикулярных плоскостях, по формуле:  $V = 0,5236 \times L \times W \times T$ , где L – длина, W – ширина, T – толщина яичника. Установлено, что объем яичника менее 3 см<sup>3</sup> свидетельствует о плохом прогнозе в отношении овариального резерва [7; 98]. Подсчет числа антральных фолликулов является более точным методом оценки овариального резерва. Согласно мнению ряда исследователей, можно выделить 3 группы яичников женщины в зависимости от данного показателя: неактивные (менее 5 фолликулов), нормальные (5 – 15 фолликулов) и поликистозные (более 15 фолликулов) [7; 97; 98]. Адекватное кровоснабжение яичников крайне необходимо для их нормального функционирования. Одним из основных доплерометрических

критериев, позволяющих прогнозировать ответ яичников на стимуляцию, является пиковая систолическая скорость (ПСС) кровотока в сосудах стромы яичника. При недостаточном ответе на стимуляцию средняя ПСС стромальных артерий на 2 – 3-й день цикла оказалась в 2 раза ниже, чем при нормальном ответе. Отмечено повышение пульсационного индекса (ПИ) и индекса резистентности (ИР) перифолликулярных сосудов яичников пациенток с недостаточным ответом на стимуляцию и нормальным уровнем ФСГ [99]. К показателям сниженного овариального резерва и недостаточного ответа относятся низкая ПСС (менее 10 см,с), высокие ПС и ИР [7].

Анти-мюллеров гормон (АМГ) – в настоящее время считается самым точным количественным методом оценки овариального резерва [100]. АМГ является представителем семейства трансформирующих факторов роста  $\beta$ , играет важнейшую роль в эмбриогенезе мужской особи млекопитающих. АМГ продуцируется клетками Сертоли, что вызывает регрессию органов мюллера протока (маточных труб, матки и верхней части влагалища) [7]. В яичниках АМГ вырабатывается от пренатального периода (с 32 недели эмбрионального развития) до менопаузы и несет ответственность за переход покоящихся примордиальных фолликулов в фазу активного роста, а также за выбор чувствительных к ФСГ фолликулов на ранней антральной стадии. Было показано, что концентрации АМГ пропорциональны количеству развивающихся фолликулов в яичниках [7; 101]. Этот гормон выделяется клетками гранулезы растущих фолликулов – от преантральной стадии до размера антральных фолликулов 6 – 8 мм в диаметре. После достижения фолликулами 8 мм и более АМГ резко падает, возрастает активность ароматазы и, соответственно, продукция эстрадиола. АМГ характеризует фолликулы на стадии, предшествующей гормонально зависимому периоду роста фолликулов, защищает гранулезу растущих фолликулов от избыточного митогенного влияния ФСГ. Это позволяет получить информацию о более глубоких процессах фолликулогенеза и оценить число растущих фолликулов на гормончувствительной стадии их роста [7; 100]. Нормативными значениями

АМГ считаются 1,0–2,5 нг/мл. Снижение уровня АМГ свидетельствует об уменьшении овариального резерва.

В 2011 году Европейским обществом репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) создана рабочая группа, которая утвердила стандартные критерии для определения «сниженного овариального резерва» [102]. Данные критерии были названы «болонскими критериями». Согласно ESHRE консенсусу [7; 102], основанием для констатации сниженного овариального резерва должны быть два из следующих трех критериев: возраст пациентки 40 лет и более; плохой ответ яичников на стимуляцию овуляции (3 и менее ооцитов); низкие показатели АМГ (АМГ менее 0.5 – 1.1 нг/мл) и сниженного количества антральных фолликулов менее 5 – 7 по данным ультразвукового исследования. Таким образом, комплексное исследование показателей овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников на этапе до хирургического лечения, позволит создать целостную картину степени повреждения овариальной ткани и выработать ранжированный подход к лечению данных пациенток.

### **1.8. Молекулярные маркеры снижения овариального резерва**

Отношение исследователей, касающееся влияния эндометриоидных образований яичников на изменение уровня АМГ, неоднозначно. В исследованиях V. Gayet, C. Chapron и др. (2012) у большинства пациентов с эндометриозом яичников значения АМГ не отличались от группы сравнения [103]. Подобные результаты были получены в работах С. Ercan (2011), V. Hirokawa (2011). [104]. Другие исследователи выявили низкий уровень АМГ у пациентов с эндометриозом яичников различной стадии распространения [105]. Y. Hwu et al. (2011) оценивая концентрацию АМГ, получили достоверно низкие значения АМГ при двусторонних эндометриоидных образованиях яичников по сравнению с односторонними [106].

Данные исследования подтверждают необходимость поиска более точных маркеров овариального резерва.

В настоящее время изучается возможность использования микро-РНК (мкРНК) в качестве нового неинвазивного маркера эндометриоза, а также в качестве маркера низкого ОР.

Микро-РНК – малые некодирующие молекулы РНК длиной в среднем 22 – 24 нуклеотида. Были открыты в 1993 году V. Ambros, Gary Ruvkun и коллегами. МкРНК принимают участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК – интерференции [107].

Учеными установлена связь мкРНК с пролиферацией эндометриоидных клеток. Группой исследователей во главе с L.A. Ramón [108] было проанализировано несколько мкРНК, связанных с ангиогенезом и ангиогенными факторами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста-А (VEGF-А) и тромбоспондин-1 (TSP-1) в эндометриоидных поражениях (ЭКЯ, очагах эндометриоза на париетальной брюшине, ретроцервикального эндометриоза) и в эутопическом эндометрии женщин с эндометриозом. Авторы использовали новейшие методы (TaqMan ПЦР) в реальном времени, чтобы оценить экспрессию мкРНК (мкР-15b,-16, - 17-5p,-20a,-21,-125a,-221 и-222), в то время как экспрессия VEGF-А и TSP-1 мРНК изучались с помощью метода ПЦР в реальном времени; содержание белков VEGF-А и TSP-1 определялось с помощью количественного метода ELISA. В исследование было включено 58 женщин с эндометриозом и 38 женщин контрольной группы [108]. Согласно результатам исследования, в парных образцах тканей эндометриоидных кист яичников обнаружены значимо более низкие показатели мРНК VEGF-А ( $p = 0.02$ ) и экспрессии самого белка ( $p = 0.002$ ), чем в эутопическом эндометрии и более высокая экспрессия миР-125a ( $p = 0.003$ ) и мкРНК-222 ( $p < 0.001$ ). Однако в ткани овариальной эндометриомы выявлена значимо более высокая экспрессия ангиогенного ингибитора TSP-1 и более низкая экспрессия мкРНК-17-5p, чем в эутопическом эндометрии ( $p < 0.001$ ). Кроме того, были обнаружены значимые обратные корреляции между экспрессией мкРНК-222 и содержанием белка VEGF-А ( $p = 0.018$ ) и между мкРНК-17-5p и содержанием белка TSP-1 ( $p = 0.022$ ). В перитонеальных поражениях продемонстрировано значимое увеличение содержания VEGF-А по сравнению с ЭКЯ ( $p < 0.01$ ). Авторы

пришли к заключению, что уровни экспрессии мкРНК, связанных с ангиогенезом, различались в эутопическом эндометрии и в ткани овариальной эндометриомы [108]. Эти различия могут оказать влияние на экспрессию ангиогенных факторов, играющих важную роль в патогенезе и патофизиологии эндометриоза. Авторы следующего исследования [109] впервые провели анализ транскриптома мкРНК (transcriptome-microRNAome) в ткани эндометриомы и в эутопическом эндометрии, используя новейшую технологию секвенирования (sequencing technology). Им удалось воспроизвести более 54 миллионов независимых мкРНК в 19 клинических образцах, при этом экспрессия некоторых мкРНК была повышена, а экспрессия других - существенно снижена. Было выявлено 10 мкРНК, экспрессия которых повышена (мкРНК-202, 193a-3p, 29c, 708, 509-3-5p, 574-3p, 193a-5p, 485-3p, 100, и 720) и 12 мкРНК, экспрессия которых существенно снижена (мкРНК-504, 141, 429, 203, 10a, 200b, 873, 200c, 200a, 449b, 375, и 34c5p) в ЭКЯ по сравнению с эутопическим эндометрием. Функциональная значимость этих различий была проверена в исследовании, выполненном на стромальных фибробластах эндометрия *in vitro*, которые показали, что во внеклеточном матриксе экспрессия мкРНК-29c была снижена, в то время как экспрессия мкРНК -29c существенно повышена [109]. Этот новый подход подтверждает вклад мкРНК в патофизиологию эндометриоза.

Многочисленные мкРНК, экспрессирующиеся в яичниках, регулируют рост фолликулов, атрезию, овуляцию и стероидогенез и играют важную роль в нарушении функции яичников [110]. Учеными установлено, что мкРНК вовлечены в пролиферацию и апоптоз клеток гранулезы [111]. Так, в недавних исследованиях установлено, что мкРНК-143 подавляет образование примордиальных фолликулов, уменьшая экспрессию циклин-зависимых киназ 4 и 6 и циклинов B1, D2 и E2 в прегранулезных клетках [112]. Кроме того, микро-РНК-181a подавляют пролиферацию клеток гранулезы в яичниках мышей, активируя рецептор ПА [113] и мкРНК-26b стимулирует апоптоз клеток гранулезы яичников [114]. Кроме того, снижение в плазме крови мкРНК-22-3p в значительной степени коррелирует со снижением овариального резерва [115]. Сверхэкспрессия мкРНК-23a усиливает

апоптоз в клетках гранулезы [111]. Таким образом, различными исследователями была выявлена роль мкРНК в патогенезе развития эндометриоза и установлено, что данные молекулы играют ключевую роль в развитии данного заболевания. Недавно открытые мкРНК как модуляторы экспрессии генов, а также их стабильность и специфичность делают их привлекательным биомаркером эндометриза кандидатом. Требуются дальнейшие исследования в области возможности использования мкРНК в качестве биомаркеров ЭКЯ и их взаимосвязи с развитием у конкретных пациенток низкого ОР.

### **1.9. Влияние хирургического лечения ЭКЯ на овариальный резерв**

Лапароскопическое хирургическое удаление ЭКЯ является эффективной терапией «первой линии», позволяющей купировать болевой синдром и сохранить репродуктивную функцию пациенток [127; 102; 116]. У женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ самым важным аспектом является сохранение фертильности, но при этом объем операции должен быть направлен на снижение риска рецидивирования ЭКЯ. В связи с этим во время оперативного вмешательства следует полностью удалять капсулу ЭКЯ. Лапароскопическая цистэктомия более предпочтительна по сравнению с лапароскопической аблацией (дренированием, коагуляцией стенки кисты), так как, возможно, снижает риск рецидивирования ЭКЯ и улучшает фертильность [117]. Однако следует проявлять большую осторожность при отделении ЭКЯ от окружающей ткани, чтобы избежать удаления нормальной ткани яичников и негативного воздействия на ОР. Есть также данные, что ушивание ткани яичника с целью гемостаза предпочтительнее в отношении сохранения ОР при больших объемах удаленной кисты и большой раневой поверхности яичника, чем электрохирургический гемостаз [118]. При этом, существует мнение, что ушивание яичника может вызвать в последствие ишемию тканей, а также формирование перивульварных спаек за счет шовного материала. Поэтому заживление дефекта яичника после энуклеации кисты вторичным натяжением может быть предпочтительным, за исключением случаев выраженного кровотечения и плохого сопоставления краев раны яичника [119]. По крайней мере,

минимизация использования энергетических методов с целью гемостаза обязательна.

По данным проспективных когортных исследований среди бесплодных женщин с умеренной и тяжелой стадией эндометриоза с последующей лапароскопией и удалением эндометриoidных поражений, спонтанная беременность наступает в 52 – 69% случаев [7; 120; 121].

В то же время, остается открытым вопрос в отношении влияния хирургического лечения женщин с ЭКЯ на ОР. Резекция яичника может непреднамеренно привести к повреждению овариального резерва. Соссиа М.Е и соавт. [122] провели проспективное когортное исследование 302 пациентов, которым выполнялась лапароскопия с целью удаления ЭКЯ. Ими было установлено, что женщины, которым выполнялись двусторонние цистэктомии на пять лет раньше вступали в климакс, чем те, кто перенес одностороннюю резекцию яичников. В исследовании S. Такае и др. [123] было подтверждено негативное влияние резекции яичников при эндометриoidных кистах на ОР, что является фактором риска преждевременного истощения яичников. Данные исследования подтверждают необходимость длительного наблюдения за ОР пациенток, перенесших резекцию яичника по поводу ЭКЯ [7].

Влияние резекции яичников при эндометриoidных кистах на ОР определяется уровнем АМГ в сыворотке крови после оперативного вмешательства [124]. E.Somigliana и др. [125] отметили снижение ОР до 53% после лапароскопического удаления ЭКЯ. Согласно данным ряда исследователей, возможной причиной снижения ОР является удаление здоровой ткани яичника вместе с эндометриoidным образованием. Так, M. Kitajima и соавт. [126] в своих исследованиях подтвердили наличие нормальной ткани яичника в энуклеированной эндометриoidной кисте, в результате чего снижение уровня АМГ происходило на 42% от исходного [7].

Таким образом, при лечении пациенток репродуктивного возраста с эндометриoidными кистами яичников самым важным остается вопрос сохранения репродуктивной функции. При удалении эндометриoidной кисты следует

соблюдать все принципы микрохирургической операции с учетом особенностей щадящего воздействия инструментов, режимов энергии (электро-, лазерной-, крио-плазма, ультразвук и т.д.) на ткань яичника (энуклеация только пораженных участков) для максимального сохранения овариального резерва [7; 127].

До настоящего времени нет однозначного ответа на вопрос о целесообразности удаления капсулы эндометриоидной кисты яичника при ее небольшом размере (до 30 мм). Согласно Глобальному Консенсусу по современному ведению эндометриоза 2013 года, лапароскопическую эксцизию следует проводить при эндометриоидных кистах размером  $> 4$  см в диаметре [7; 128]. Как было сказано выше, наличие эндометриоидной кисты в яичнике приводит к раннему развитию фолликулов и их атрезии, нарушается регуляция отбора фолликулов в результате чего исчерпывается пул примордиальных фолликулов, качество оставшихся примордиальных фолликулов оказывается низким. Таким образом, наличие эндометриоидных кист и связанные с ними структурные изменения ткани в корковом слое яичников, могут быть причиной снижения овариального резерва. Рядом ученых было установлено, что эти процессы наблюдаются и при ранней стадии развития эндометриоидных кист яичников, начиная от 1 до 4 см. [7; 129]. Данные результаты являются аргументом против выжидательной тактики в случае наличия ЭКЯ. Ранняя диагностика и хирургическое вмешательство может быть целесообразным у женщин с ЭКЯ с целью сохранения функции яичников.

Также остается спорным вопрос, является ли повреждение ткани яичников во время хирургического удаления эндометриоидных кист более серьезным, чем повреждение коркового слоя яичников в результате токсического влияния эндометриоидной кисты. Согласно ряду исследований [7; 130], выявлена статистически значимая корреляция между степенью снижения уровня АМГ в сыворотке крови и диаметром эндометриоидной кисты и предоперационным уровнем сывороточного АМГ. Скорость снижения АМГ после операции была значительно выше в подгруппе женщин с эндометриоидными кистами диаметром более 7 см, чем в подгруппе женщин с эндометриоидными кистами диаметром

менее 7 см. Снижение овариального резерва находится в обратной зависимости от предоперационного уровня АМГ в сыворотке крови. Возраст пациенток является фактором, который негативно влияет на овариальный резерв [7; 130]. В исследованиях Lind T и др. было показано выраженное снижение уровня АМГ при двусторонних ЭКЯ, чем при одностороннем поражении яичника. Значительное сокращение уровня АМГ было у женщин с исходно высоким и средним уровнем – на 23% и 43% через 3 и 6 месяцев, соответственно. Женщины с исходно низким уровнем АМГ имели минимальные или нулевые изменения после оперативного лечения. Послеоперационное снижение АМГ было больше через 3 месяца у женщин со значительным интраоперационным кровотечением (500 и 700 мл). Возраст пациенток, размер кисты, продолжительность операции не были предиктором послеоперационного снижения уровня АМГ в данном исследовании [7; 131].

Общепризнано (P.Vercellini и др., 2009, 2013), что, даже после удаления эндометриоза опытным хирургом, частота рецидивирования симптомов и эндометриоидных поражений колеблется в пределах от 10% до 55 % в течение 12 месяцев [132], в последующем у остальных женщин рецидивы возникают примерно в 10% случаев ежегодно [133].

Таким образом, оценка состояния овариального резерва до операции, выбор оптимальной хирургической тактики с учетом репродуктивного резерва пациентки, тщательное удаление капсулы эндометриоидной кисты, бережное отношение к окружающей ткани яичника и минимизация электрохирургического воздействия на здоровые фолликулы, является залогом успешного лечения и восстановления репродуктивной функции. Стандартизация хирургических подходов в лечении ЭКЯ, должное обучение хирургов лапароскопической технике является одним из путей к получению наилучших результатов.

### **1.10. Выбор энергии при удалении эндометриоидных кист яичников с позиции сохранения овариального резерва**

Вопрос о выборе энергии при хирургическом удалении ЭКЯ с позиций сохранения ОР является спорным. Известно, что риск повреждения ткани яичника при использовании монополярной коагуляции более высокий. Это связано с тем, что монополярная коагуляция обладает отсроченным коагулирующим действием на ткани яичника и не всегда предсказуемо в отношении глубины воздействия [7; 134]. Отличием биполярной электрохирургии является локальность воздействия, что позволяет контролировать границы деструкции. Однако многие исследования подтверждают, что биполярная коагуляция в отличие от плазменной энергии и СО<sub>2</sub>-лазера имеет более выраженное отрицательное влияние на состояние овариального резерва [7; 135]. Так в исследованиях Н. Роман и др., в которое были включены 22 женщины с односторонней эндометриоидной кистой, диаметром более 30 мм, без предшествующего ранее хирургического вмешательства и не имеющие беременность в анамнезе, установлено, что до операции (удаления эндометриоидной кисты яичника с использованием плазменной энергии) средние значения АМГ составили  $3,9 \pm 2,6$  нг/мл, через три месяца после операции  $2,3 \pm 1,1$  нг/мл и  $3,1 \pm 2,2$  нг/мл в конце периода наблюдения уровень АМГ более 2 нг/мл составил 71% случаев в послеоперационном периоде (в конце наблюдения), против 76% случаев до операции. А.И. Давыдов и соавт., (2012) считают, что аргоноплазменную энергию отличает не только минимальное повреждающее воздействие на ткань яичника, но и полная деструкция эндометриоидной выстилки ЭКЯ [7; 136]. При аргоно – плазменной коагуляции происходит бесконтактная, равномерная коагуляция обширных участков тканей за счет того, что струя плазмы образует аргоновое облако, которое под воздействием высокочастотной энергии образует аргоноплазменную дугу и энергия бесконтактно передается на подлежащую ткань. При этом не происходит перегревания и обугливания тканей, так как аргон - инертный газ и препятствует горению. Непрерывная подача газа снижает температуру на поверхности ткани, таким образом, формируется минимальная зона некроза, а поток аргона позволяет произвести эффективную

коагуляцию [136; 137]. Исследуя гистологические препараты после воздействия потока плазмы А.И. Давыдов, О.В. Чабан показали, что струп состоит из трех зон, которые представлены тонким гибким слоем: тонкий обугленный слой, под которым находится промежуточный губчатый уровень некроза, и еще глубже обнаруживается более компактный слой некроза [138]. Между зоной коагуляции и видимой неизменной тканью яичников образуется переходная зона некоагуляционного некроза, где клетки подвергаются деструкции, но коллагеновые волокна мало изменены, так как температурного воздействия недостаточно для коагуляции ткани. По гистологическим данным, наиболее безопасным является режим коагуляции с низкой мощностью воздействия (20 Ватт) с дистанцией 1,0 см. При этом режиме глубина поражения наименьшая и достаточная для остановки кровотечения. Результаты данного исследования схожи с исследованиями Н.Roman и др., которыми отмечено, что после плазменной коагуляции капсулы ЭКЯ зона некроза определялась как плотная и однородная ацеллюлярная ткань, четко отграниченная от соседних тканей. При этом глубина некроза в среднем составила 145 мкм. [139]. При сравнении состояния яичников после цистэктомии и после использования аргоноплазменной энергии обнаружено достоверное снижение объема яичников, количества антральных фолликулов, уровня АМГ после цистэктомии [136; 138]. Аргоноплазменная коагуляция позволяет максимально удалить ткань кисты с минимальным повреждением окружающей ткани яичника.

В настоящее время большое внимание уделяется использованию СО<sub>2</sub>-лазера.

СО<sub>2</sub>-Лазерная абляция является наиболее выгодной, поскольку она обеспечивает точное испарение эндометриодных поражений при этом обеспечивая хороший гомеостаз при минимальном повреждении окружающих тканей. Последнее особенно важно в случае удаления эндометриальных кист в яичнике, поскольку позволяет сохранить овариальный резерв [140] Лазер (LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)- это устройство, которое создает электромагнитное излучение в различных диапазонах длин волн: видимого света, ультрафиолетового или инфракрасного излучения, используя стимулированное

излучение [141]. CO<sub>2</sub>-лазер представляет собой газовый лазер на основе газовой смеси углекислого газа, азота, водорода и гелия. Основные спектральные линии находятся в пределах длины волны 9,4 и 10,6 мкм, а излучаемая мощность достигает 100 кВт при непрерывной работе. CO<sub>2</sub> – лазер может: мгновенно испаряться и разрушать клетки и ткани при 100°C; проводить коагуляцию на глубину до 2,7 мм при испарении углерода; осуществлять коагуляцию на глубину от 40 до 800 мкм в содержащих воду тканях; запаивать кровеносные сосуды диаметром от 0,5 до 2 мм; быть расфокусированным для коагуляции тканей без их испарения. В литературе имеются доказанные данные о безопасности и эффективности использования лазерной технологии на основе CO<sub>2</sub> [141]. Согласно J. Donnez и др., глубина абляции не может быть более чем на 1,0–1,5 мм. Таким образом, этот метод, по-видимому, избирательно разрушает поверхностную выстилку кисты (железистый эпителий и подлежащую строму), не достигая фиброзной капсулы, окружающей эндометриому или прилежащий корковый слой яичника. Для решения проблемы сохранения овариального резерва после операции J. Donnez и др. предложили трехэтапную методику лечения пациенток с ЭКЯ [142; 143]. Первый этап: во время лапароскопии дренируется содержимое кисты яичника. Для исключения злокачественного роста производится биопсия стенки кисты и гистологическое исследование. Второй этап: применяются аГнРг в течение трех месяцев, чтобы уменьшить диаметр кисты, стромальную васкуляризацию и интенсивность железистой митотической активности эндометриоза. Третий этап: повторная лапароскопия, при которой выполняется лазерная вапоризация внутренней стенки кисты CO<sub>2</sub>-лазером [142; 143]. Методика использования CO<sub>2</sub>-лазера для абляции ЭКЯ опробована многими исследователями. В работах М. Candiani (2018), Н. Roman (2018) показано, что при использовании CO<sub>2</sub>-лазера в послеоперационном периоде не происходит снижения овариального резерва, увеличивается частота благоприятных исходов ЭКО и не отмечается увеличения частоты рецидивирования ЭКЯ по сравнению с биполярной энергией. Также использование абляции ЭКЯ с помощью CO<sub>2</sub>-лазера оправдано у пациенток с ЭКЯ, которые уже ранее перенесли хирургическое вмешательство по поводу

эндометриоза, имеют сниженный ОР и неудачные попытки ЭКО в анамнезе [144; 145]. Однако, применение альтернативных энергий биполярной энергии противоречиво. R. Hart в 2008 году опубликовал Кокрановский обзор, в котором показал, что «стриппинг» (энуклеация капсулы ЭКЯ) предпочтительнее с позиции снижения риска рецидивирования ЭКЯ и увеличения частоты наступления спонтанной беременности по сравнению с техникой абляции CO<sub>2</sub>-лазером [117]. В работах E. Posadzka и соавт., не выявлены различия в уровне АМГ через 3 и 6 мес после операции в группах с биполярной коагуляцией и CO<sub>2</sub>-лазерной абляцией ЭКЯ. Эти же авторы сообщают о повышении риска рецидивирования ЭКЯ после использования энергии лазера [146].

Рабочая группа, сформированная из членов Европейского общества гинекологической эндоскопии (ESGE), Европейского общества репродукции и эмбриологии человека (ESHRE) и Всемирного общества эндометриоза (WES), разработала ряд практических рекомендаций по различным аспектам хирургического вмешательства при ЭКЯ [147]. Этот документ охватывает технические аспекты различных методов хирургии ЭКЯ. При использовании лазерной абляции целесообразно соблюдать следующие правила: необходимо удалить всю внутреннюю поверхность стенки кисты с помощью лазерного луча, при этом используются настройки мощности 30–55 Ватт для лазерного луча CO<sub>2</sub> и 6–10 Вт для волокна CO<sub>2</sub>. Лазер должен применяться в таком режиме, чтобы он мог удалять ткани, сохраняя при этом основную здоровую ткань. Необходимо испарять капсулу ЭКЯ только до тех пор, пока окрашенная гемосидерином пигментная ткань не будет видна (пока цвет не изменится с красноватого на желто-белый). Вся глубина капсулы кисты не нуждается в испарении, так как эндометриоидная ткань присутствует только поверхностно [147]. При использовании плазменной энергии необходимо придерживаться следующих рекомендаций: удалять всю внутреннюю поверхность стенки кисты, используя энергию плазмы в режиме коагуляции, на расстоянии в среднем 5 мм от кончика наконечника; старайтесь испарять капсулу ЭКЯ только до тех пор, пока окрашенная гемосидерином пигментная ткань больше не будет видна; обработать все области и удалить края участка инвагинации [147].

При использовании биполярной коагуляции рекомендуется начинать с более низкой мощности и регулировать ее в зависимости от эффективности коагуляции. Ключевым моментом является использование очень короткого времени коагуляции для минимизации повреждения ткани яичника, так как о глубине разрушения может быть трудно судить. Биполярная диатермия является более безопасным способом, чем монополярная, но повреждение тканей может быть более глубоким, чем при лазерной и плазменной абляции; следовательно, яичник должен часто охлаждаться ирригационной жидкостью [147]. Комбинированная трехступенчатая техника, предложенная J. Donnez, рекомендована для лечения ЭКЯ больших размеров с целью сохранения репродуктивной функции пациенток [142; 143; 147].

Использование различных адгезивных веществ (цианоакрилатный клей, фибриновый клей, тромбин) с целью гемостаза ложа кисты, позволяет уменьшить электрохирургическое воздействие на здоровую ткань яичника и сохранить овариальный резерв, что особенно важно у пациенток репродуктивного возраста с бесплодием. В исследованиях A. Ebert и др., показана высокая эффективность применения желатинового-тромбинового матрикса с целью гемостаза по сравнению с биполярной коагуляцией. [148]. R. Anjoli и др., также показано положительное влияние использования двухкомпонентного гемостатического геля после энуклеации ЭКЯ на функциональное состояние яичника после операции [149]. В исследованиях Y-C. Liu и соавт. [150] с целью гемостаза после энуклеации капсулы кисты использовали гемостатический клей, состоящий из факторов свертывания крови - фибриногена, XIII фактора и тромбина, а также из антифибринолитического агента – апротинина и хлорида кальция. Данный фибриновый герметик также помимо своих гемостатических свойств поддерживает васкуляризацию, миграцию фибробластов и, таким образом, ускоряет процессы заживления. Использование гемостатического клея позволило достичь полного гемостаза, уменьшить время операции и объема интраоперационной кровопотери. В послеоперационном периоде объем яичника был достоверно выше в основной группе пациенток по сравнению с контрольной

группой, где с целью гемостаза использовалась электроэнергия ( $7,8 \pm 2,4$  см против  $7,0 \pm 2,3$  см,  $p = 0,033$ ). Использование данного трехкомпонентного гемостатического клея имеет преимущество перед двухкомпонентными гелями в том, что он снижает риски развития перивариальных спаек [150]. Несмотря на разнообразие хирургических техник лечения ЭКЯ, частота наступления спонтанной беременности остается не высокой (в пределах 30%). Эта цифра снижается вдвое после повторного оперативного вмешательства по поводу рецидива ЭКЯ. Использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у пациенток с ЭКЯ, также не улучшает результаты наступления беременности.

### **1.11. Влияние хирургического лечения ЭКЯ у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на результаты экстракорпорального оплодотворения (ЭКО)**

Остается спорным вопрос, является ли повреждение ткани яичников во время хирургического удаления эндометриоидных кист более серьезным, чем повреждение коркового слоя яичников в результате токсического влияния эндометриоидной кисты. Пациентки с ЭКЯ часто требуют индивидуализированного ведения в зависимости от репродуктивных планов в настоящем или в будущем. Неоднозначным является проведение оперативного лечения при ЭКЯ у женщин репродуктивного возраста с бесплодием в анамнезе, планирующих ЭКО. Решающей ролью в степени успешности программы ВРТ у женщин с бесплодием является адекватный ответ яичников на гиперстимуляцию. У женщин с малым количеством фолликулов прогноз ЭКО намного хуже, несмотря на использование повышенных доз гонадотропинов. Имеются доказательства того, что после цистэктомии чувствительность яичников к гонадотропинам снижается [151; 152]. В ряде исследований, в том числе в метаанализе S. Gupta и соавт, было показано, что число развивающихся фолликулов и количество извлеченных ооцитов ниже в группе пациенток, перенесших оперативное вмешательство на яичниках по поводу ЭКЯ, по сравнению с контрольной группой, в которой

операций не проводилось, также отмечено снижение роста доминантных фолликулов в 34% оперированных яичников [153; 154; 155]. При оценке результатов ЭКО после оперативного лечения ЭКЯ, исследователями установлено снижение частоты клинических беременностей (8,5% против 20,2%) и живорождений (4,2% против 13,4%) на цикл ЭКО у пациентов со низким ОР в результате хирургического воздействия, чем у пациентов с идиопатическим снижением ОР (A. Roustan 2015 г, С. Maignien 2017 г., SB. Hong 2017) [156; 157; 158]. Полученные данные в работах В.Ю. Смольниковой [90; 159] показали, что активность процессов фолликуло – и оогенеза в ответ на проводимую гонадотропную стимуляцию достоверно снижена в группах женщин с эндометриозом III – IV стадии распространения, с наличием ЭКЯ в анамнезе. Также в данном исследовании выявлено, что при I – II стадии распространения эндометриоза показатели наступления беременности на один стимулированный цикл и на один перенос эмбрионов в полость матки снижаются в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой, при III стадии эндометриоза данные показатели ниже в 2 раза и при IV стадии – в 3 раза [90; 159]. Лишь один из 10 проведенных циклов ЭКО приводит к рождению живого ребенка при эндометриозе IV стадии. Согласно ретроспективному исследованию Н. Park и др. [160], повторные хирургические вмешательства на яичнике при рецидивирующих ЭКЯ обладают большим негативным эффектом на ответ яичников во время ЭКО, имплантацию и клинические показатели беременности, по сравнению с результатами пациенток, которым не проводилось повторной операции по поводу ЭКЯ. Таким образом, результаты ряда метаанализов показали, что хирургическое вмешательство при эндометриозе не улучшает репродуктивные результаты в циклах ЭКО у пациенток с бесплодием, связанным с ЭКЯ. С точки зрения результатов ЭКО польза от хирургического вмешательства при ЭКЯ неясна. Как было описано выше не только операция снижает овариальный резерв, но и присутствие ЭКЯ оказывает токсическое влияние на окружающую ткань яичника. I. Díaz и соавт. [161] проанализировали случаи ЭКО с донорскими ооцитами и сообщили, что частота беременности значительно снизилась при проведении ЭКО с использованием

ооцитов от пациентов с эндометриозом, независимо от состояния реципиентов. Согласно проспективному исследованию О. Shebl и др. [162], частота встречаемости ооцитов метафазы II и морфологически нормальных ооцитов была значительно ниже в группе с эндометриозом, чем в группе с отсутствием эндометриоза. Стадия эндометриоза IV была достоверно связана с ооцитами худшего качества, чем стадии I – III, а также частота имплантации и клинической беременности после ЭКО у пациенток с III – IV стадией эндометриоза ниже (на 21%) по сравнению с I – II стадией [163]. Геморрагическое содержимое кисты является хорошей питательной средой для бактерий, поэтому существуют риски возникновения тазовых абсцессов после пункции яичников с эндометриоидными кистами. О данном осложнении неоднократно сообщалось рядом ученых [153]. Основываясь на результаты многих исследований, а также на положения Глобального Консенсуса по современному ведению эндометриоза 2013 года, операции по поводу ЭКЯ перед ЭКО могут быть проведены в следующих случаях: во – первых, при наличие выраженного болевого синдрома, связанного с эндометриозом и отсутствие эффекта от консервативной терапии, во-вторых, когда злокачественная опухоль не может быть исключена [127; 128; 153]. В-третьих, согласно рекомендациям Европейского общества репродукции и эмбриологии 2014 года, для пациентов с ЭКЯ более 3 см рекомендуется лапароскопическая цистэктомия перед ЭКО, с целью снижения риска возникновения тазового абсцесса после пункции фолликулов, облегчения доступа к фолликулам и улучшения ответа яичника на контролируруемую стимуляцию [164; 127; 128; 152]. В-четвертых, хирургическое вмешательство может быть рассмотрено, когда в анамнезе у женщин с ЭКЯ имеются неудачные попытки ЭКО. Восстановление нормальной анатомии органов малого таза во время операции может помочь улучшить результаты ЭКО у этих женщин [164; 165]. Таким образом, с точки зрения результатов ЭКО, польза от хирургического вмешательства при ЭКЯ неясна. ЭКО как средство достижения беременности не может преодолеть всех негативных последствий ЭКЯ на фертильность. ЭКО может быть менее эффективным при эндометриозе, чем в случае других причин бесплодия, однако, следует иметь в

виду, что его использование улучшает успех в реализации репродуктивной функции, по сравнению с выжидательной тактикой.

### **1.12. Тактика ведения женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ в послеоперационном периоде**

Лапароскопическая цистэктомия является, в настоящее время, «золотым стандартом» лечения ЭКЯ. Согласно Глобальному Консунсусу по ведению эндометриоза 2013 года Лапароскопическое хирургическое удаление эндометриоза – эффективное лечение первой линии для купирования связанной с эндометриозом боли [128]. Однако, даже при тщательном удалении капсулы ЭКЯ во время операции, в послеоперационном периоде сохраняются риски рецидивирования процесса. После хирургического лечения рецидивы ЭКЯ возникают с частотой до 21% в течение первых 2 лет, 40–45% - через 5 лет после операции и 55% – через 5–7 лет после операции [126]. Рецидивы заболевания могут быть в результате роста *in situ* очагов или клеток, не полностью удаленных во время операции, из-за роста микроскопических очагов, не обнаруженных во время операции, или развития очагов *de novo* и комбинации их [166]. Высокие риски рецидивирования ЭКЯ диктуют необходимость использования противорецидивной терапии в послеоперационном периоде.

Согласно рекомендация ведущих мировых гинекологических обществ по ведению эндометриоза [127; 128; 164] комбинированные оральные контрацептивы (КОК) являются эффективным медикаментозным лечением, способным минимизировать риски рецидивирования ЭКЯ после хирургического удаления кисты. С целью профилактики рецидивов ЭКЯ в послеоперационном периоде КОК следует назначать тем женщинам, которые в ближайшее время не планируют беременность. Непрерывный режим приема КОК обладает значительными преимуществами по сравнению с циклическим режимом. [167; 127; 168]. Тем не менее, до настоящего времени нет достаточных данных о влиянии эстрогенового компонента в составе КОК на течение заболевания. Нельзя исключить стимулирующего влияния эстрогенов на прогрессирование эндометриоза. В

качестве терапии первой линии может рассматриваться и монотерапия прогестагенами. Прогестагены обладают центральным блокирующим эффектом на гипоталамо – гипофизарную ось, уменьшая тем самым секрецию эстрогенов яичниками [169]. Также прогестагены ингибируют экспрессию генов и белков, участвующих в активации ароматазы, циклооксигеназы (ЦОГ-2), простагландина E2. Прогестагены увеличивают соотношение прогестероновых рецепторов (PR- $\beta$  / PR $\alpha$ ), а также уменьшает соотношение эстрогеновых рецепторов (ER $\beta$  / ER $\alpha$ ) [170; 171]. Терапия прогестеронами должна осуществляться в непрерывном режиме и в достаточно высоких дозах, на фоне которых развивается аменорея. Наиболее часто в настоящее время используют диеногест (2 мг/сут) и внутриматочную систему с левоноргестрелом (20 мг/сут). Ряд долговременных исследований продолжительностью до 65 дней показали высокую эффективность и безопасность диеногеста [174; 171]. Медикаментозная терапия второй линии включает агонисты гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ). В основном применяют депо – формы аГнРГ, внутримышечные инъекции, либо подкожные импланты, которые вводят один раз в 28 дней продолжительностью 2 – 4 мес. Возможна терапия ежедневными интраназальными спреями. При использовании аГнРГ формируется состояние гипоэстрогении, поэтому необходимо проводить мониторинг минеральной плотности костной ткани и сочетать данную терапию с возвратной терапией заместительными гормональными средствами [127; 128].

Новыми методами лечения эндометриоза, требующими дальнейших исследований для подтверждения их эффективности и безопасности, являются ингибиторы ароматазы (ИА), агонисты гонадотропин – релизинг гормона (агонисты ГнРГ), анти – туморнекротический фактор  $\alpha$  (анти-TNF- $\alpha$ ), селективный модулятор рецептора эстрогена (SERMs), селективный модулятор рецептора прогестерона (SPRM), высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук (HIFU) [173; 174; 175; 176; 177; 178; 179].

В случае ведения женщин с ЭКЯ в сочетании с бесплодием подход к лечению до ЭКО должен быть индивидуальным. В ряде клинических исследований [180; 181] было показано увеличение частоты клинической беременности в 4,28 раза в

группе женщин с ЭКЯ, которые до ЭКО получали терапию аГнРГ в течение 3 – 6 месяцев, по сравнению с контрольной группой, где лечение аГнРГ до ЭКО не проводилось. Агонисты гонадотропин – релизинг гормона могут снижать концентрации различных провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6. В результате это может снизить токсическое воздействие перитонеальных цитокинов на ооциты или эмбрионы. Длительное подавление гипофиза до ЭКО может быть полезным для женщин с эндометриозом в сочетании с бесплодием [181]. С другой стороны, длительное введение аГнРГ может подавлять экспрессию факторов имплантации и приводить к снижению восприимчивости эндометрия [181]. V. Muller и др. [182] провел проспективное когортное исследование, в котором сравнивали показатели частоты наступления беременности в следующих 3 группах после хирургического вмешательства по поводу ЭКЯ: группа пациентов, принимавших 2 мг диеногеста в день в течение 6 месяцев до ЭКО (группа I), группа пациентов, у которых проводилось ежемесячное лечение аГнРГ в течение 6 месяцев до ЭКО (группа II) и группа пациентов, у которых не было гормональной терапии до ЭКО (группа III). Показатели беременности в группах I, II и III составляли 44,7%, 34,3% и 16,7%, соответственно. Значительная разница в частоте клинической беременности была обнаружена между группами I и III ( $p = 0,012$ ). Не было обнаружено существенных различий между группами II и III [182]. Согласно утверждению экспертов Американского общества по репродуктивной медицине применение аГнРГ за 3–6 месяцев до процедуры ЭКО/ИКСИ у женщин с эндометриозом повышает частоту наступления клинической беременности. Недостаточно доказательств в поддержку использования КОК перед процедурой ЭКО/ИКСИ в данном случае [128; 164]. Также остается нерешенным вопрос о времени проведения ЭКО после хирургического удаления ЭКЯ у женщин с бесплодием. Недавно было опубликовано ретроспективное исследование сроков проведения различных методов высокорепродуктивных технологий (ВРТ) в послеоперационном периоде. В. AlKudmani и др. [183] сообщили, что частота наступления беременности была значительно выше, когда ЭКО выполнялось между 7 и 25 месяцами после операции по поводу ЭКЯ, по сравнению с

выполнением ЭКО сразу, либо через 3 месяца после операции. Следовательно, если ЭКО планируется после хирургического вмешательства по поводу эндометриоза, следует рассмотреть возможность введения длительной гормональной терапии до ЭКО для увеличения частоты наступления беременности. Дополнительные проспективные исследования по этой теме должны быть проведены в будущем [128].

### **1.13. Заключение**

Таким образом, в связи с противоречивыми мнениями о сохранности овариального резерва при эндометриоидных кистах яичников, отсутствия единого мнения о влиянии различных хирургических энергий на овариальную ткань, а также в ряде случаев малочисленность и разнородность групп пациенток, включаемых в исследование, возникает необходимость в продолжении исследований по изучению овариального резерва у женщин с эндометриоидными кистами яичников с использованием современных молекулярно-генетических методов.

## Глава 2. Материал и методы исследования

### 2.1. Материал исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦАГиП им академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (директор - академик РАН, профессор, д.м.н. Г.Т. Сухих). Для выполнения поставленных задач в исследование было включено 136 пациентов репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников, поступивших на лечение в гинекологическое отделение (руководитель – академик РАН, профессор, д.м.н. Л.В. Адамян) Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации за период 2016 – 2017 гг. Все пациенты были обследованы и пролечены в соответствии с Порядком оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» № 572н.

Когортное исследование носило проспективный характер. Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе с целью изучения причин снижения овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ до оперативного лечения на основании состояния овариального резерва все пациентки были разделены на две группы:

- **Первую (I) группу** составили 87 пациенток с исходно нормальным овариальным резервом до операции.

- **Вторую (II) группу** составили 49 пациенток с исходно низким овариальным резервом до операции.

Согласно дизайну исследования (Рисунок 5) на первом этапе до хирургического лечения изучалось состояние овариального резерва у пациенток с эндометриоидными кистами яичников. С этой целью проводилось исследование уровня АМГ, ФСГ, оценка состояния фолликулярного аппарата яичников по данным УЗИ до операции. Проводился сравнительный анализ клинических данных, данных анамнеза. Далее всем 136 пациенткам было проведено

оперативное лечение в объеме лапароскопии, резекции яичников, гистероскопии, диагностического выскабливания эндометрия. Показаниями для оперативного лечения явились наличие болевого синдрома и бесплодия при эндометриоидных кистах яичников, а также ЭКЯ больших размеров. Удаленный во время операции биологический материал отправляли на гистологическое исследование. Часть материала (фрагменты капсулы ЭКЯ и эндометрия) отправляли для выделения мкРНК.

На втором этапе исследования в обеих группах пациентов проводилось изучение состояния овариального резерва через 3 и 6 месяцев оперативного лечения. С целью выяснения причин снижения овариального резерва в послеоперационном периоде у пациенток с изначально нормальным овариальным резервом, I группа женщин была разделена на две подгруппы на основании состояния овариального резерва.

Через 3 месяца после операции:

- **Первую (I<sub>a</sub>)<sub>3</sub> подгруппу** составили 17 пациенток с низким овариальным резервом.
- **Вторую (I<sub>b</sub>)<sub>3</sub> подгруппу** составили 70 пациенток с нормальным овариальным резервом.

Через 6 месяцев после операции:

- **Первую (I<sub>a</sub>)<sub>6</sub> подгруппу** составили 18 пациенток с низким овариальным резервом.
- **Вторую (I<sub>b</sub>)<sub>6</sub> подгруппу** составили 69 пациенток с нормальным овариальным резервом.

Результаты исследования овариального резерва в послеоперационном периоде сопоставляли с клиническими, лабораторными показателями, интраоперационными данными, объемом выполненной операции. Изучалась репродуктивная функция пациенток после операции (Рисунок 5).



Рисунок 5 - Дизайн исследования.

Для осуществления третьего этапа исследования часть образцов тканей капсулы эндометриоидной кисты яичника и эутопического эндометрия были отправлены для выделения микро-РНК. Исследование выполнялось в лаборатории молекулярной патофизиологии ФГБУ «НМИЦАГиП им академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – к.х.н. М.Ю. Бобров). Полученный материал был разделен на две группы, в зависимости от состояния овариального резерва пациенток до операции (Рисунок 6).



Рисунок 6 - Дизайн третьего этапа исследования.

В каждой группе образцов тканей изучалась экспрессия мкРНК в эктопическом эндометрии (ткани ЭКЯ) и в эутопическом эндометрии. С помощью биоинформационного анализа проводилось выделение генов-мишеней дифференциально экспрессированных мкРНК. Полученные данные сопоставлялись с состоянием овариального резерва у пациенток с ЭКЯ и возможным участием дифференциально экспрессирующихся мкРНК и их генов – мишеней в патогенетических процессах развития эндометриоза.

**Критерии включения пациенток в исследование:**

1. Возраст пациенток 18 – 37 лет;
2. Наличие эндометриоидной кисты яичника;
3. Отсутствие тяжелой сопутствующей соматической патологии;
4. Отсутствие гормональной терапии в анамнезе в течение 6 месяцев;
5. Подписанное информированное согласие.

**Критерии невключения пациенток в исследование:**

1. Наличие злокачественных новообразований в анамнезе;
2. Нарушение менструального цикла в анамнезе;
3. Наличие тяжелой сопутствующей патологии.

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1. Клинические методы исследования**

На первом этапе нами были тщательно изучены данные анамнеза пациенток с эндометриоидными кистами яичников. Уделялось внимание изучению преморбидного фона, пренесенные ранее и наличие в настоящее время сопутствующей гинекологической и экстрагенитальной патологии. Изучалась менструальная функция (возраст менархе, наличие в анамнезе ювенильных маточных кровотечений, продолжительность менструального цикла, длительность менструации и объем теряемой крови, нарушение менструального цикла). Особое

внимание уделялось изучению репродуктивной функции (паритет, течение и исходы беременностей, количество аборт и беременностей, закончившихся выкидышами, наличие бесплодия в анамнезе, попытки ЭКО в анамнезе, причины бесплодия). При изучении данной патологии уделялось внимание жалобам (болевой синдром, связь его с менструальным циклом, наличие бесплодия), длительности существования данной эндометриодной кисты, наличию в анамнезе операций на органах малого таза в анамнезе по поводу эндометриоза.

Клиническое обследование включало: общий осмотр, оценку телосложения, конституциональные особенности, состояние сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной, эндокринной, мочевыделительной, пищеварительной систем, молочных желез. Гинекологический статус определяли на основании осмотра наружно-половых органов, исследования влагалища и шейки матки в зеркалах, бимануального влагалищного исследования, ректо-вагинального исследования по показаниям.

### **2.2.2. Лабораторные методы исследования**

Лабораторные исследования проводились по общепринятым методикам до поступления в стационар, перед операцией и в послеоперационном периоде. Из лабораторных методов исследования были использованы: клинический анализ крови, общий анализ мочи, определение групповой и резус принадлежности крови, анализ биохимических параметров и гемостазиограммы, реакция Вассермана, тесты на наличие вирусной инфекции, гормональное исследование (фолликулостимулирующий гормон, антимюллеров гормон), электрокардиография, рентгенография органов грудной полости, микроскопическое исследование отделяемого половых органов на состав микрофлоры, цитологическое исследование шейки матки. По показаниям проводилось ультразвуковое исследование сердца, органов брюшной полости. Всех женщин перед оперативным лечением консультировали терапевт и анестезиолог, при необходимости осуществлялась консультация другими специалистами. Всем 136 пациенткам до и через 3 и 6 месяцев после операции

проводилось исследование уровня АМГ, ФСГ. Уровень АМГ в сыворотке венозной крови измеряли методом иммуноферментного анализа с чувствительностью 0,08 нг/мл. Уровень АМГ трактовали как низкий при показателях менее 1,1 нг/мл, согласно Болонским критериям [28], а также до и через 3 и 6 месяцев после операции оценивался уровень ФСГ в сыворотке крови, проводился подсчет антральных фолликулов и объем яичников при УЗ исследовании. Для выделения РНК из плазмы крови образцы венозной крови женщин с эндометриоидными кистами яичников собирали в пробирки VACUETTE® с ЭДТА, центрифугировали 20 минут при 300g (4С), отбирали плазму, и повторно центрифугировали в течение 10 минут при 14500g. РНК выделяли из 200 мкл плазмы крови набором Serum Plasma (Qiagen) с предварительным добавлением  $5,6 \times 10^8$  копий синтетической мкРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. cel-miR-39 использовали в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза кДНК и количественной ПЦР в реальном времени.

### **2.2.3. Инструментальные методы исследования**

**УЗИ органов малого таза** выполняли в отделении функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – профессор, д.м.н. А.И. Гус) с помощью приборов Aloka ProSound Alpha 10 (Япония), Toshiba Xario (Япония), с использованием трансабдоминального и трансвагинального датчиков 3,5 и 5,0 МГц. При эхографии в процессе исследования серией продольных, поперечных и косых сканирований в режиме реального времени определяли: положение, размеры (длина, передне-задний, ширина) анатомическую форму и структуру матки, толщину эндометрия, размеры и структуру яичников. Уделялось особое внимание состоянию яичников. Оценивали объем яичников, количество антральных фолликулов. Производилось измерение диаметра эндометриоидной кисты, количество кист, одно-или двусторонне поражение яичников, оценивалось содержимое кисты. Обращалось внимание на наличие спаечного процесса в малом тазу, эндометриоидных гетеротопий в ретроцервикальной области, в толще стенки матки. При

необходимости проводили ультразвуковое исследование других органов (почек, печени, желчного пузыря, щитовидной железы).

#### 2.2.4. Хирургические методы обследования и лечения

**Лапароскопию** выполняли в гинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – академик РАН, д.м.н., профессор Л.В. Адамян) в условиях эндотрахеального наркоза по стандартной закрытой методике. После опорожнения мочевого пузыря, при горизонтальном положении больной на спине в положении для литотомии через разрез в области пупка в брюшную полость вводили иглу Вереша и с помощью инсuffлятора Endoflator или Thermoflator (KarlStorzGmbH&Co., Германия) осуществляли наложение пневмоперитонеума с давлением в 15 мм.рт.ст. Для наложения пневмоперитонеума использовали газ CO<sub>2</sub>. После извлечения стилета в гильзу троакара вводили лапароскоп HopkinsII (0°) (KarlStorzGmbH&Co., Германия) и больную переводили в положение Тренделенбурга (20-30°). Для дополнительных проколов брюшной стенки использовали 5 мм троакары с винтовой нарезкой (AppleMedicalCorp., США или KarlStorzGmbH&Co., Германия). При проведении вмешательств использовали: электрохирургические генераторы Autocon 200 и Autocon 350 и стандартные моно- и биполярные инструменты (KarlStorzGmbH&Co., Германия), мощностью до 60 Вт, работающие в непрерывном режиме и режиме ультрапульсации.

При лапароскопии оценивали одно- или двусторонность поражения яичников, уточнялись размеры и количество кистозных образований, их место расположения в яичнике и содержимое. Обращалось внимание на наличие сопутствующих опухолей и опухолевидных образований в яичниках. Проводился осмотр внешней поверхности матки, оценивались ее размеры, форма, консистенций, состояние серозного покрова, наличие патологических образований матки, подвижность матки. Изучалось состояние маточных труб, их проходимость с помощью хромопертубации, состояние фимбрий, наличие спаек. Оценивалась степень выраженности спаечного процесса, характер спаек, их структура,

вовлечение в спаечный процесс соседних органов малого таза и органов брюшной полости. Изучали локализацию и распространенность наружно-генитального эндометриоза: на брюшине малого таза, в области Дугласова пространства, крестцово-маточных связок, на органах брюшной полости. Уточнялась степень распространения эндометриоза по классификации Л.В. Адамян (1998 г.) [9]. Производился осмотр органов брюшной полости, обращалось внимание на наличие опухолей брюшной полости, состояние аппендикса, печени, желчного пузыря, сальника.

Далее производилось вылушивание капсулы эндометриоидной кисты с максимальным сохранением здоровой ткани яичников и фолликулов. Для этого захватывали зажимом белочную оболочку яичника, рассекали механическими ножницами ткань яичника над эндометриоидной кистой, аспирировали ее содержимое и промывали полость. Затем двумя механическими зажимами захватывали капсулу кисты и ткань яичника и постепенно вылушивали капсулу путем переменных противотракций. Далее, проводился осмотр ложа кисты и точечная коагуляция участков повышенной кровоточивости с помощью биполярного коагулятора до достижения гемостаза. С целью избежания некроза ткани яичника коагуляция начиналась с более низкой мощности (35 Ватт). При недостаточной эффективности гемостаза мощность коагуляции увеличивалась до 45 Ватт. Ключевым моментом гемостаза являлось очень короткое время экспозиции биполярной энергии с целью минимизации повреждения ткани яичника. Также при необходимости проводился адгезиолизис, сальпинговариолизис, коагуляция и/или иссечение очагов наружного генитального эндометриоза.

**Гистероскопия** позволяла изучить состояния полости матки и уточнить характер внутриматочной патологии жестким гистероскопом фирмы “Karl Storz” с наружным диаметром 5 мм. Полость матки осматривали при наполнении ее стерильным физиологическим раствором хлорида натрия. Гистероскопию проводили под внутривенным наркозом. Гистероскопия у всех пациенток сочеталась с диагностическим выскабливанием эндометрия и последующим

гистологическим исследованием соскобов. При резектоскопии использовали гистерорезектоскоп “Karl Storz” с наружным диаметром 8 мм, с оптикой 0 и 12 градусов.

Состояние больной в послеоперационном периоде оценивали по результатам клинического анализа крови, анализа мочи, гемостазиограммы и биохимических показателей крови, контрольного ультразвукового исследования. В послеоперационном периоде проводили комплекс реабилитационных мероприятий, направленных на улучшение трофики тканей и условий заживления, восстановление полноценной генеративной функции. Программа реабилитации включала воздействие физическими факторами с первых суток после операции в интенсивном режиме. Всем пациенткам была назначена антибиотикотерапия. По показаниям в послеоперационном периоде проводили симптоматическое медикаментозное лечение. Послеоперационный период у всех 136 пациенток протекал без осложнений, женщины были выписаны под наблюдение гинеколога по месту жительства на 3 – 5 сутки после операции.

#### **2.2.5. Морфологическое исследование**

Всем пациентам производилось гистологическое исследование макропрепаратов, удаленных в ходе оперативного лечения. Патоморфологическое исследование выполнялось в 1-ом патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – профессор, д.м.н. А.И. Щеголев).

Изучали операционный материал (капсулы кист яичников, иссеченные очаги эндометриоза, соскоб эндометрия и эндоцервикса) и парафиновые срезы, включающие соскоб эндометрия, капсулу кисты яичника, слизистую полости матки и цервикального канала. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином (обзорная окраска).

Небольшая часть тканей капсулы кисты и эутопического эндометрия были отправлены для выделения микро-РНК методом секвенирования. Данный этап исследования проводился в лаборатории молекулярной патофизиологии ФГБУ

«НМИЦАГиП им академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель – к.х.н. М.Ю. Бобров).

## **2.3. Статистическая обработка данных**

### **2.3.1. Статистическая обработка клиническо – лабораторных данных**

Статистический анализ клиническо – лабораторных данных был произведен на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и программы «Statistica V10» (США), SPSSSoftwareV22.0 (США). Для качественных данных определяли доли и риски (%). Для определения статистической значимости различий средних величин использовали t-критерий Стьюдента. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5% ( $p \leq 0,05$ ). Вычисляли:  $M$  — среднее,  $\sigma$  — стандартное (среднее квадратическое) отклонение,  $n$  — объем анализируемой подгруппы,  $p$  — уровень значимости. Для анализа таблиц сопряженности и сравнения категориальных данных в двух и более группах, а также для оценки значимых различий между ними использовали тест  $\chi^2$ . Сравнение бинарных данных и определение статистической значимости связи между фактором риска и исходом производилось с помощью расчета отношения шансов (OR) с доверительным интервалом 95% (95% CI). Исследование было одобрено к проведению на заседании этического комитета ФГБУ «НМИЦАГиП им академика В.И. Кулакова» МЗ РФ МЗ РФ от 29 марта 2016 г.

### **2.3.2. Транскриптомный анализ**

Полученная тотальная РНК из отобранных на основании клиническо-анамнестических данных образцов использовалась для создания библиотек кДНК и последующего секвенирования. Библиотеки кДНК из выделенных образцов готовили с использованием наборов NEBnext по методикам, рекомендованным производителем. Качественный и количественный анализ библиотек проводили при помощи микроэлектрофореза (Agilent) и флуориметрии (Qubit, ThermoFisher Sci). Секвенирование проводили на платформе Illumina NextSeq с использованием

реагентов и расходных материалов фирмы Illumina (NextSeq 500/550 High Output v2 kit). Качество секвенирования оценивали при помощи сервиса BaseSpace (Illumina) по следующим параметрам: плотность кластеров, интенсивность сигнала в каналах детекции, доля кластеров, прошедших фильтр, по выходу выровненных прочтений. Все параметры не выходили за пределы допустимых значений.

Для оценки экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени, выделенная из тканей РНК, включающая микроРНК, была преобразована в кДНК с использованием набора miScript II RT (Qiagen) по протоколу производителя. Для приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР использовали набор miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Реакцию проводили в термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) в следующей последовательности: вначале 15 мин при 95°C, затем 40 циклов по 15 сек при 94°C., по 30 сек при оптимизированной температуре отжига (52-60°C) и по 30 сек при 70°C. В качестве эндогенного контроля для образцов ткани использовали SNORD68, для плазмы крови cel-miR-39.

Выделенную из тканей эндометрия тотальную РНК также использовали для исследования экспрессии генов, которое проводили при помощи микроматричного анализа на чипах GeneChip™ Human Gene 2.0 ST (Affymetrix, ThermoFisher) по методикам рекомендованным производителем.

### **2.3.3. Вестерн-блот анализ**

Образцы белков были подготовлены путем инкубации тканей в буфере для выделения, с последующим нагревом до 95°C в течении 3 минут. Денатурированные белки разделяли при помощи электрофореза в 7%-полиакриламидном геле, а затем разделенные фракции переносили на нитроцеллюлозные мембраны методом электропереноса. Далее мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе, состоящем из обезжиренного сухого молока 5% и 0,1% Тритона X100 в фосфатно-солевом буфере. Далее мембрану обрабатывали первичными антителами (1:500) FZD7 или актину (Santa-Cruz, USA) в течение ночи при 4°C. Затем, после промывки блокирующим раствором, мембрану инкубировали 1 ч. при комнатной температуре с антителами,

конъюгированными с пероксидазой хрена. После промывки, на мембрану наносили люминесцентный субстрат, и далее хемилюминесценцию детектировали на приборе GelDoc (Bio-Rad).

#### **2.3.4. Биоинформационная обработка данных**

Анализ структуры, качества и соответствия целевой длине прочтений проводили с использованием программы fastQC. Последовательности нуклеотидов, полученные в результате секвенирования, подвергались процессингу при помощи программы Cutadapt 1.9.1 для удаления адаптеров, после чего рассчитывалось количество прочтений с адаптером и общее количество для оценки качества пробоподготовки и секвенирования и для возможности использования в дальнейшем анализе.

Выравнивание полученных последовательностей на референс мкРНК человека проводилось по базе данных miRBase версии 21 (mirbase.org) с использованием программы Bowtie 1.2. Сортировка, индексирование и слияние файлов для подсчета количества прочтений для дальнейшего анализа проводилась при помощи программы Samtools.

Оценку представленности каждой мкРНК в библиотеке и анализ дифференциальной экспрессии в группах с учетом множественных сравнений выполнялся в среде R при помощи пакета DeSeq2. Результаты анализа форматировались в табличном виде с указанием среднего количества прочтений для каждой мкРНК в группах сравнения, логарифма кратности изменений ( $\log_2FC$ ), стандартной ошибки кратности изменений и значения вероятности ошибки первого рода, скорректированного после поправки на множественные сравнения, для гипотезы об отсутствии различий в экспрессии для каждой мкРНК в анализируемых группах.

Для всех групп сравнения в модель включалась информация о принадлежности к группе и о пациенте, от которого был забран материал. В результате обработки данных были получены наборы дифференциально-экспрессированной мкРНК (дэ-мкРНК) для различных групп сравнения:

эутопический (Eu) и эктопический (Ec) эндометрий при низком (L) и нормальном (N) овариальном резерве.

В каждой группе была проведена фильтрация наборов по следующим параметрам: достоверность отличий с учетом множественных сравнений ( $p < 0,05$ ) и кратность изменений ( $FC \geq 2$ ).

Поиск генов-мишеней для мкРНК проводился при помощи базы валидированных взаимодействий miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>). Отбор мишеней проводился на основании информации о валидации взаимодействий мРНК-мкРНК двумя и более методами, в результате получали списки только тех генов-мишеней, для которых регуляторная роль мкРНК была экспериментально доказана. Анализ экспрессии генов выполнен программой Transcriptome Analysis Console (Affymetrix, ThermoFisher). Обогащение путей внутриклеточной сигнализации и биологических процессов по базе данных KEGG (<http://www.genome.jp>) и Wik-ipathways (<http://www.wikipathways.org>) было проведено при помощи программы Cytoscape 3.4.09 и плагина JEPETTO10.

## Глава 3. Результаты собственных исследований

### 3.1 Клинико – лабораторная характеристика и состояние ОР женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ на этапе до хирургического лечения

Проведен сравнительный анализ результатов клинического обследования и лечения 136 пациенток репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников.

На этапе до хирургического лечения всем женщинам с эндометриоидными кистами яичников была произведена оценка состояния ОР, что позволило нам всех пациентов, включенных в данное исследование разделить на следующие группы: I группа – 87 пациенток с исходно нормальным овариальным резервом до операции и II группа – 49 пациенток с исходно низким овариальным резервом до операции (Таблица 2).

Таблица 2 - Состояние овариального резерва женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников до хирургического лечения

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
Уровень АМГ в сыворотке крови, нг/мл	4,02 ± 2,24	0,78 ± 0,32	0,0000**
Уровень ФСГ в сыворотке крови, МЕ/л	5,36 ± 2,41	9,15 ± 3,06	0,000022**
Кол-во антральных фолликулов (по УЗИ) > 5	75 (86,2%)	21 (42,9%)	28, 372/0,000**
Кол-во антральных фолликулов (по УЗИ) < 5	12 (13,8%)	28 (57,1%)	

\*\* -  $p < 0,001$

Таким образом, уровень АМГ в сыворотке крови в I группе был значительно выше нижнего уровня порогового значения (согласно Болонским критериям) и составил 4,02 ± 2,24 нг/мл (по сравнению с 0,78 ± 0,32 нг/мл в среднем во II группе).

Также имелись достоверные различия между обеими группами по уровню ФСГ в сыворотке крови ( $5,36 \pm 2,41$  МЕ/л в I группе и  $9,15 \pm 3,06$  МЕ/л во II группе,  $p = 0,00002$ ). Но при этом отмечалось, что в группе низкого овариального резерва не во всех случаях уровень ФСГ был выше пороговых значений (в 38,8% случаев уровень ФСГ оставался в пределах нормы). Данные гормонального обследования состояния овариального резерва на этапе до хирургического лечения согласуются с данными ультразвукового обследования. Была выявлена прямая зависимость между уровнем АМГ и количеством антральных фолликулов в яичниках по данным УЗИ. Количество антральных фолликулов менее 5 по УЗИ в I группе пациенток было в 13,8% случаев, во II группе пациенток в 57,1% случаев ( $p < 0,05$ ).

Все 136 пациенток находились в репродуктивном возрасте. Средний возраст пациенток обеих групп составил  $30,53 \pm 3,86$  лет. Учитывая данные ряда последних исследований [56,57,58] о том, что в возрасте 37,5 лет резко сокращается пул примордиальных фолликулов (до 25000 фолликулов) и увеличивается скорость их исчезновения, в нашу работу были включены женщины в возрасте от 18 до 37 лет. В возрасте до 30 лет было 62 пациентки (45,6%), старше 30 лет – 74 женщины (54,4%).

Следует отметить, что возраст женщин с эндометриоидными кистами на момент оперативного лечения был значимо больше во II группе (Таблица 3) и составил  $32,02 \pm 3,5$  года по сравнению с  $29,44 \pm 3,82$  года в I группе ( $p = 0,000109$ ). При этом в группе низкого ОР на этапе до хирургического лечения преобладали пациентки возрастной группы старше 30 ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3 - Распределение пациенток по возрасту

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
Средний возраст, лет	$29,44 \pm 3,82$	$32,02 \pm 3,50$	0,000109**
18 – 30 лет	49 (56,3%)	13 (26,5%)	11, 215/0,0011*
31 – 37 лет	38 (43,7%)	36 (73,5%)	

\*- $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

Основными жалобами, предъявляемыми пациентками обеих групп были болевой синдром и бесплодие. Жалобы на боли внизу живота постоянные, либо усиливающиеся перед менструацией предъявляли 95 женщин (69,9%) из 136, при этом в I группе 55 пациенток (63,2%), во II группе 40 пациенток (81,6%),  $p = 0,032$ . Болезненные менструации отметили 89 женщин (65,4%) из 136. В I группе дисменорея встречалась у 52 пациенток (59,8%), во II группе у 37 пациенток (75,5%),  $p = 0,09$ . Диспареуния присутствовала у 27 пациенток (19,8%) из 136. В I группе жалобы на диспареунию предъявляли 16 пациенток (18,4%), во II группе – 11 (22,4%),  $p = 0,655$ . Бесплодием страдали 53 женщины из 136 (39%) - 31 пациентка (35,6%) в I группе и 22 пациентки (44,9%) во II группе,  $p = 0,3601$  (Таблица 4). Жалобы отсутствовали только у 5 женщин из 136 (3,7%) – у 4 пациенток (4,6%) в I группе и у 1 пациентки (2%) II группе,  $p = 0,654$ . При отсутствии жалоб ЭКЯ были выявлены случайно на очередном профилактическом осмотре.

Таблица 4 - Жалобы пациенток с ЭКЯ

Показатель	Все пациентки с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациентки с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациентки с низким ОР до операции (n=49)	
Боли внизу живота	55 (63,2%)	40 (81,6%)	5,047/0,032*
Дисменорея	52 (59,8%)	37 (75,5%)	3,434/0,090
Диспареуния	16 (18,4%)	11 (22,4%)	0,324/0,655
Бесплодие	31 (35,6%)	22 (44,9%)	1,132/0,3601
Отсутствие жалоб	4 (4,6%)	1 (2%)	0,579/0,654

\*-  $p < 0,05$

При оценке жалоб пациенток обеих групп было установлено, что болевой синдром существовал достаточно длительное время до момента обнаружения ЭКЯ. В I группе женщин боли внизу живота с локализацией в правую или левую подвздошную область существовали в среднем  $18,49 \pm 14,05$  месяцев, во II группе

продолжительность болевого синдрома была в среднем  $31,66 \pm 26,70$  месяцев,  $p = 0,006$ . ЭКЯ были обнаружены в среднем через 6 месяцев после появления выше описанных жалоб в I группе и через 18 месяцев во II группе женщин (Рисунок 7).

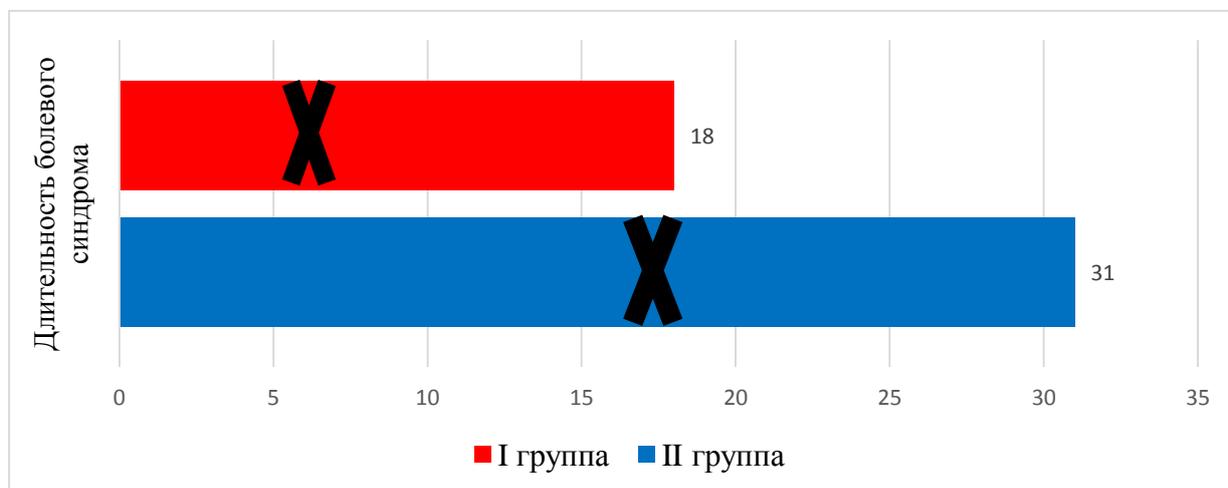


Рисунок 7 - Длительность существования болевого синдрома и момент обнаружения ЭКЯ.

Таким образом, жалобы на болевой синдром, отсутствие беременности послужили основанием для дальнейшего обследования, проведения ультразвукового исследования органов малого таза, в результате чего были выявлены эндометриоидные кисты яичников.

При анализе генеративной функции отмечалась низкая частота беременностей в анамнезе у пациенток обеих групп. Из 136 женщин беременности наступали только у 38 (27,9%). При этом беременности в анамнезе были у 27 женщин (31%) I группы и у 11 женщин (22,4%) II группы,  $p = 0,285$  (Рисунок 8).



Рисунок 8 - Частота встречаемости беременности в группах.

Данные беременности закончились родами у 23 женщин из 136 (17%). При этом в I группе роды были у 16 пациенток (18,4%) во II группе - у 7 (14,3%)  $p = 0,638$ . Самопроизвольные выкидыши были у 11 пациенток из 136 (8,1%) – у 8 женщин (9,2%) из I группы и у 3 женщин (6,1%) из II группы,  $p = 0,529$ . Аборты в анамнезе делали 4 пациентки из 136 (2,9%) - 2 пациентки (5,7%) из I группы и 2 пациентки (4,1%) II группы,  $p = 1,0$ . При анализе исходов беременности у пациенток с ЭКЯ до проведения операции, достоверных различий в группах не выявлено, (Таблица 5).

Таблица 5 - Паритет женщин с ЭКЯ до оперативного лечения

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
Роды	16 (18,4%)	7 (14,3%)	0,376/0,638
Аборты	5 (5,7%)	2 (4,1%)	0,178/1,0
Выкидыши	8 (9,2%)	3 (6,1%)	0,398/0,529
Внематочная беременность	1 (1,1%)	2 (4,1%)	1,249/0,264
Первичное бесплодие	25 (28,7%)	19 (38,8%)	1,444/0,230
Вторичное бесплодие	6 (6,9%)	3 (6,1%)	0,030/0,862
Безуспешные попытки ЭКО	4 (4,6%)	3 (6,1%)	0,149/0,700

Первичное бесплодие встречалось у 44 женщин из 136 (32,4%), в I группе у 25 (28,7%), во II группе у 19 женщин (38,8%),  $p = 0,230$ . Вторичное бесплодие было у 9 пациенток из 136 (6,6%), при этом у 4 женщин (4,6%) в I группе и у 3 женщин (6,1%) во II группе,  $p = 0,862$ . Статистической достоверности в частоте встречаемости первичного и вторичного бесплодия в группах выявлено не было. Следует отметить, что длительность бесплодия была значительно больше в группе низкого овариального резерва, по сравнению с группой нормального овариального резерва ( $5,18 \pm 3,11$  лет и  $2,97 \pm 2,47$ , соответственно),  $p = 0,009$ . Бесплодие

продолжительностью более 5 лет достоверно чаще встречалось в группе низкого ОР,  $p = 0,01$  (Таблица 6).

Таблица 6 - Длительность бесплодия у больных ЭКЯ

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
1 – 2 года	19 (21,8%)	6 (12,2%)	1,923/0,166
3 – 5 лет	7 (8,0%)	6 (12,2%)	0,639/0,424
Более 5 лет	5 (5,7%)	10 (20,4%)	6,866/0,01*

\*-  $p < 0,05$

При изучении соматического анамнеза пациенток с ЭКЯ, достоверных различий в структуре экстрагенитальной патологии не выявлено (Таблица 7). Наиболее часто в анамнезе встречались инфекции в детском возрасте 83,9% и 85,7% в I и II группах, соответственно. Среди заболеваний сердечно – сосудистой системы (ССС) встречались пролапс митрального клапана, гипертоническая болезнь, варикозное заболевание вен нижних конечностей. Заболевания желудочно – кишечного тракта (ЖКТ) были представлены в основном хроническим гастритом, хроническим холециститом, дискинезией желчевыводящих путей. Имелась также патология печени (хронические гепатиты, синдром Жильбера). В структуре патологии органов дыхания были выявлены хронический тонзиллит, хронический бронхит, бронхиальная астма. В структуре заболеваний мочевыделительной системы встречались хронический цистит, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь. Эндокринная патология была представлена в основном патологией щитовидной железы. В 19,5% и в 12,2% случаев в I и II группах соответственно была выявлена миопия слабой и средней степени.

Таблица 7 - Экстрагенитальная патология у пациенток с ЭКЯ

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
Заболевания ССС	<b>23 (16,9%)</b>		0,666/0,415
	13 (14,9%)	10 (20,4%)	
Заболевания ЖКТ	<b>39 (28,7%)</b>		0,656/0,418
	27 (31,0%)	12 (24,5%)	
Заболевания печени и желчевыводящих путей	<b>17 (12,5%)</b>		0,369/0,544
	12 (13,8%)	5 (10,2%)	
Заболевания органов дыхания	<b>27 (19,8%)</b>		0,599/0,689
	19 (21,8%)	8 (16,3%)	
Заболевания мочевыделительной системы	<b>22 (16,2%)</b>		0,271/0,603
	13 (14,9%)	9 (18,4%)	
Эндокринная патология	<b>22 (16,2%)</b>		2,223/0,137
	11 (12,6%)	11 (22,4%)	
Заболевания органов зрения	<b>23 (16,9%)</b>		1,187/0,298
	17 (19,5%)	6 (12,2%)	
Инфекционные заболевания в детском возрасте	<b>115 (84,6%)</b>		0,078/0,78
	73 (83,9%)	42 (85,7%)	

Гинекологические заболевания в анамнезе встречались у 114 пациенток из 136 (83,8%). При этом патологию органов малого таза перенесли 65 женщин (74,7%) группы нормального ОР и 46 женщин (93,8%) группы низкого ОР. Различия в частоте встречаемости гинекологических заболеваний среди пациенток обеих групп были статистически значимы,  $p = 0,00539$ . Структура гинекологической патологии представлена в Таблице 8.

Таблица 8 - Перенесенные гинекологические заболевания в анамнезе

Показатель	Все пациентки с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациентки с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациентки с низким ОР до операции (n=49)	
Вся гинекологическая патология	<b>114 (83,8%)</b>		7,674/0,00539*
	65 (74,7%)	46 (93,8%)	
Эктопия шейки матки	<b>75 (55,1%)</b>		0,135/0,737
	49 (56,3%)	26 (53,1%)	
Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ)	<b>64 (47,1%)</b>		0,113/0,858
	40 (46%)	24 (40,8%)	
Миома тела матки	<b>23 (16,9%)</b>		3,130/0,096
	11 (12,6%)	12 (24,5%)	
Аденомиоз	<b>24 (17,6%)</b>		4,159/0,059
	11 (12,6%)	13 (26,5%)	
Наружно – генитальный эндометриоз брюшины малого таза	<b>24 (17,6%)</b>		19,203/0,00003**
	6 (6,9%)	18 (36,7%)	
Эндометриоидные кисты яичников	<b>21 (15,4%)</b>		13,502/0,0004**
	6 (6,9%)	15 (30,6%)	
Полипы и гиперплазии эндометрия	<b>12 (8,8%)</b>		1,115/0,349
	6 (6,9%)	6 (12,2%)	
Кистозные образования яичников	<b>13 (9,6%)</b>		0,639/0,545
	7 (8,0%)	6 (12,2%)	
Пороки развития половых органов	<b>4 (2,9%)</b>		0,349/0,619
	2 (2,3%)	2 (4,1%)	

\*-p < 0,05; \*\*- p < 0,001

В структуре всей гинекологической патологии наиболее часто встречались эктопия шейки матки у 75 (55,1%) и воспалительные заболевания органов малого таза у 64 (47,1%) из 136 пациенток. Однако статистически достоверных различий в группах среди данной патологии обнаружено не было: Эктопия шейки матки имела в анамнезе у 49 пациенток (56,3%) в I группе и у 26 (53,1%) пациенток во

II группе,  $p = 0,737$ . ВЗОМТ страдали 40 (46%) женщин в I группе и 24 (40,8%) женщины во II группе,  $p = 0,858$ . Наружно-генитальный эндометриоз (НГЭ) брюшины малого таза имелся в анамнезе у 24 (17,6%) женщин из 136, эндометриоидные кисты яичников – у 21 (15,4%) женщин из 136. При этом эндометриоз брюшины малого таза и ЭКЯ в анамнезе достоверно чаще встречались в группе пациенток с низким овариальным резервом. В I группе эндометриоз брюшины малого таза был выявлен ранее у 6 (6,9%) женщин, во II группе – у 18 (36,7%) женщин,  $p = 0,00003$ . ЭКЯ имелись ранее у 6 пациенток (6,9%) I группы и у 15 (30,6%) пациенток II группы,  $p = 0,0004$ , (Рисунок 9).



Рисунок 9 - Частота встречаемости НГЭ в структуре гинекологической патологии обеих групп.

Таким образом, рецидив эндометриоидной кисты отмечен у 6 (6,9%) больных I группы и у 15 (30,6%) больных II группы, т.е. статистически чаще наблюдался среди пациентов со сниженным ОР до оперативного лечения ( $p = 0,0004$ ). Исходя из структуры гинекологической патологии, можно предположить, что инфекционно – воспалительные заболевания органов малого таза, наружно – генитальный эндометриоз имеющиеся в анамнезе пациенток, могли послужить фоном для развития низкого овариального резерва.

Согласно нашим данным при оценке менструальной функции, менархе у большинства женщин в обеих группах было в 12 - 14 лет (в среднем  $13,6 \pm 0,97$  лет).

Нами были выявлены различия в длительности менструального цикла в обеих группах. В группе низкого ОР менструальный цикл длился в среднем  $26,67 \pm 2,3$  дней, тогда как в группе нормального овариального резерва длительность менструального цикла была в среднем  $28,66 \pm 2,99$  дней,  $p = 0,000029$ . Известно, что укорочение менструального цикла по сравнению с имевшейся длительностью является неблагоприятным признаком и может указывать на снижение ОР. Как правило этот признак наблюдается у женщин старшего возраста, либо у молодых женщин, перенесших операции на яичнике [96]. В нашем исследовании длительность менструального цикла во II группе менее 26 дней была в 47% случаев, тогда как в I группе пациенток менструальный цикл длился более 26 дней в 81,6% случаев,  $p = 0,002$  (Таблица 9).

Таблица 9 - Характеристика менструального цикла у женщин с ЭКЯ

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=49)	
<b>Возраст наступления менархе</b>			
9 – 11 лет	5 (5,7%)	4 (8,2%)	0,296/0,6
12 – 14 лет	77 (88,6%)	40 (81,6%)	1,232/0,286
15 – 16 лет	5 (5,7%)	5 (10,2%)	0,914/0,34
<b>Продолжительность менструального цикла</b>			
Средняя продолжительность менструального цикла	$28,66 \pm 2,9$	$26,67 \pm 2,3$	0,000029**
21 – 23 дня	3 (3,4%)	4 (8,2%)	1,427/0,233
24 – 26 дней	13 (14,9%)	19 (38,8%)	9,895/0,002*
27 – 29 дней	54 (62,2%)	18 (36,7%)	8,075/0,005*
30 – 35 дней	15 (17,2%)	7 (14,3%)	0,202/0,65
36 – 42 дня	2 (2,3%)	1 (2,0%)	0,01/0,92
<b>Длительность менструального кровотечения</b>			
Менее 3-х дней	3 (3,4%)	4 (8,2%)	1,427/0,233

Продолжение Таблицы 9

4 – 6 дней	66 (75,9%)	33 (67,3%)	1,148/0,285
Более 7 дней	18 (20,7%)	12 (24,5%)	0,263/0,61
<b>Количество теряемой крови</b>			
Скудные	1 (1,1%)	1 (2%)	0,172/0,679
Умеренные	52 (59,8%)	23 (47,0%)	2,086/0,15
Обильные	34 (39,1%)	25 (51,0%)	1,819/0,18
Межменструальные кровянистые выделения мажущего характера до менструации	11 (12,6%)	4 (8,2%)	0,641/0,424
Межменструальные кровянистые выделения мажущего характера после менструации	6 (87,4%)	3 (6,1%)	0,03/0,86

\*- $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

По данным анамнеза, операции по поводу экстрагенитальной патологии (аппендицита, холецистита, паховых грыж) встречались у 14 (10,3%) из 136 женщин, при этом 11 (12,6%) пациенток из I группы и 3 (6,1%) пациентки из II группы,  $p = 0,230$ . Также, кесарево сечение было в анамнезе у 4-х (2,9%) женщин из 136 – у 3-х пациенток (3,4%) I группы и у 1 пациентки (2,0%) II группы,  $p = 0,447$ .

Следует отметить, что операции на яичниках в анамнезе перенесли 28 женщин (20,6%) из 136 - 9 пациенток (10,3%) из I группы и 19 пациенток (38,8%) из II группы ( $p = 0,00014$ ), что статистически достоверно явилось риском снижения ОР.

Резекцию яичника по поводу ЭКЯ в анамнезе выполнялась у 21 женщины (15,4%) из 136, при этом у 6 пациенток (6,9%) в I группе и у 15 пациенток (30,6%) во II группе ( $p = 0,0004$ ), Операции по поводу доброкачественных опухолей (ДОЯ)

в анамнезе были у 3-х пациенток (2,2%) из 136, при этом - 1 пациентка (1,1%) в I группе и 2 пациентки (4,1%) во II группе,  $p = 0,264$ . Коагуляция яичника по поводу апоплексии проводилась 4 женщинам из 136 (2,9%), при этом – у 2 (2,3%) пациенток I группы и также у 2 женщин (4,1%) II группы,  $p = 0,555$  (Рисунок 10).

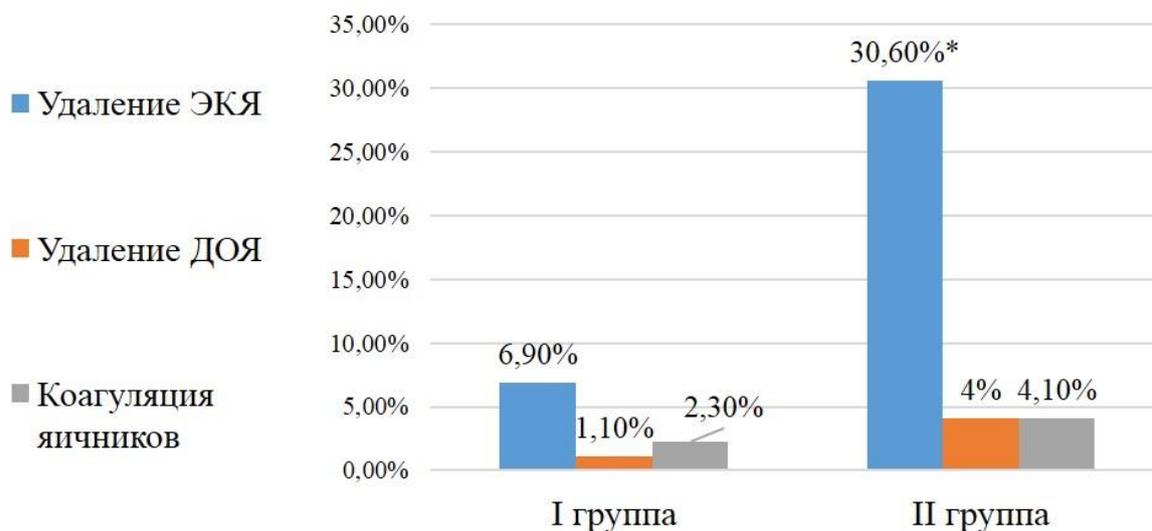


Рисунок 10 - Структура оперативных вмешательств на яичниках в анамнезе.

Интраоперационно уточнялся размер ЭКЯ, латеральность поражения и стадия распространения эндометриоза. Односторонние ЭКЯ выявлены у 95 (69,9%) женщин, двусторонние ЭКЯ - у 41 пациентки (30,1%) из 136. При этом одностороннее поражение яичников эндометриоидными кистами было у 67 женщин (77%) в I группе и у 28 женщин (57,1%) во II группе,  $p = 0,016$ . Двусторонние ЭКЯ отмечены у 20 женщин (23%) I группы и у 21 женщины (42,9%) II группы соответственно,  $p = 0,016$  (Рисунок 11).

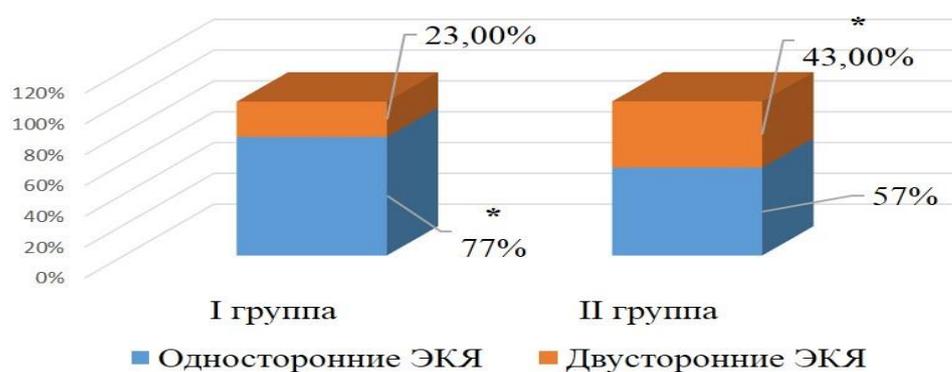


Рисунок 11 - Латеральность поражения яичников эндометриоидными кистами.

Общий размер опухоли составил  $7,87 \pm 4,70$  см во II группе по сравнению с  $6,01 \pm 4,17$  см в I группе пациенток,  $p = 0,0227$ . Таким образом, ЭКЯ больших размеров статистически достоверно преобладали в группе женщин с исходно низким ОР. ЭКЯ диаметром более 4 см были выявлены у 81 женщины из 136 (59,6%), ЭКЯ диаметром менее 4 см – у 55 женщин из 136 (40,4%). При этом достоверно чаще в группе исходно низкого ОР встречались ЭКЯ диаметром более 4х см, так, у 44 женщин (50,6%) в I группе и у 37 женщин (75,5%) во II группе,  $p = 0,005$  (Рисунок 12).

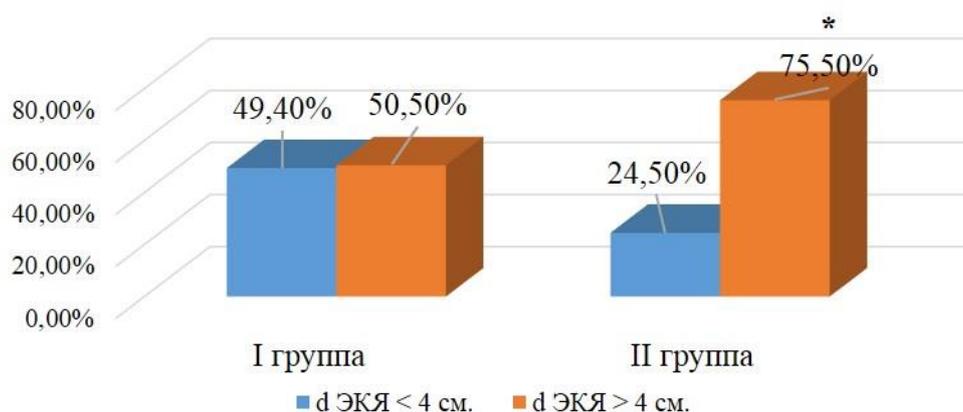


Рисунок 12 - Диаметр ЭКЯ в группах исходно нормального и низкого ОР.

При анализе латеральности поражения яичников эндометриоидными кистами и размеров ЭКЯ выявлено, что односторонние кисты диаметром менее 4-х см были у 38 женщин из 136 (27,9%), односторонние ЭКЯ диаметром более 4-х см - у 55 женщин из 136 (40,4%). Двусторонние ЭКЯ диаметром менее 4-х см встречались у 17 женщин из 136 (12,5%). Двусторонние кисты диаметром более 4-х см (одна или обе ЭКЯ) присутствовали у 26 женщин из 136 (19,1%).

Таблица 10 – Латеральность поражения яичников ЭКЯ

Показатель	Все пациентки с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациентки с нормальным ОР до операции (n=87)	II группа, пациентки с низким ОР до операции (n=49)	
Односторонние ЭКЯ d менее 4 см	<b>38 (27,9%)</b>		3,487/0,062
	29 (33,3%)	9 (18,4%)	

## Продолжение таблицы 10

Односторонние ЭКЯ d более 4 см	<b>55 (40,4%)</b>		
	38 (43,7%)	17 (34,7%)	1,050/0,306
Двусторонние ЭКЯ d менее 4 см	<b>17 (12,5%)</b>		
	14 (16,1%)	3 (6,1%)	2,848/0,092
Двусторонние ЭКЯ одна или обе d более 4 см	<b>26 (19,1%)</b>		
	6 (6,9%)	20 (40,8%)	23,324/0,0001**

\*\* -  $p < 0,001$

Статистически достоверно чаще в группе пациенток с исходно низким ОР встречались двусторонние ЭКЯ диаметром более 4-х см. Так установлено, что во II группе 20 пациенток (40,8 %) имели двусторонние кисты диаметром более 4 см по сравнению с 6 пациентками (6,9%) в I группе,  $p < 0,001$  (Рисунок 13).

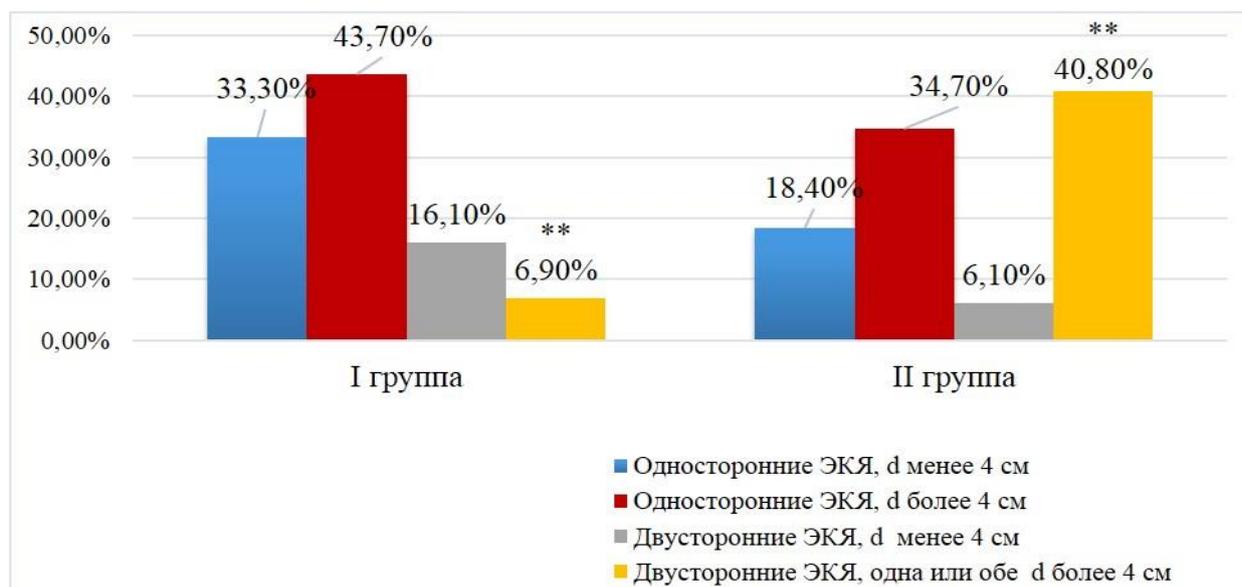


Рисунок 13 - Ранжирование кист в зависимости от размеров и латеральности поражения яичников.

Интраоперационно также была оценена стадия распространения эндометриоза (использовалась классификация Л.В. Адамян, 1998 г.). 1 – 2 стадия эндометриоза выявлена у 74 (54,4%) из 136 пациенток, 3 – 4 стадия – у 62 (45,6%) из 136 пациенток. В I группе пациенток 1 – 2 стадии распространения процесса

встречалась у 58 женщин (66,7%), 3 – 4 стадии у 29 женщин (33,3%). Во II группе пациенток 1 – 2 стадии имелась у 16 пациенток (32,7%) и 3 – 4 стадии у 33 пациенток (67,3%). Различия в группах по стадиям распространения эндометриоза явились статистически значимыми,  $p = 0,00016$  (Рисунок 14).

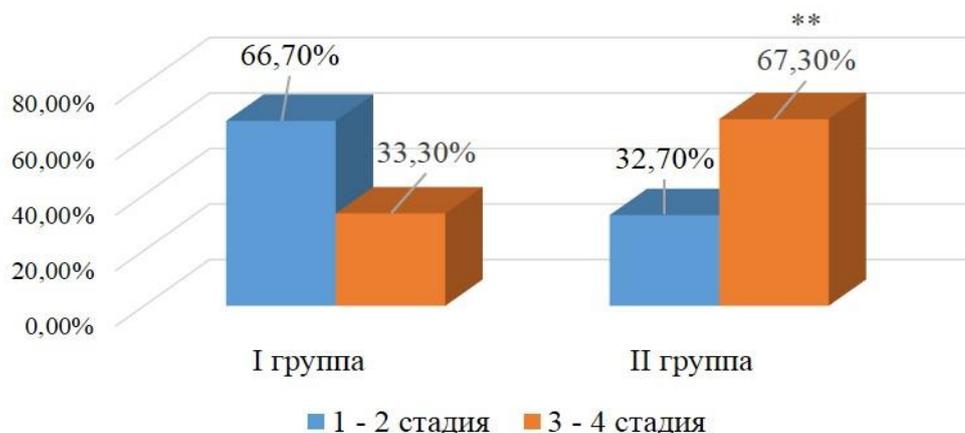


Рисунок 14 - Стадия распространения эндометриоза.

Таким образом, низкий овариальный резерв до операции был ассоциирован с возрастом пациенток старше 30 лет, наличием в анамнезе операций на яичниках (в том числе по поводу ЭКЯ), рецидивом ЭКЯ, стадией распространения процесса (3 – 4 ст), двусторонним поражением яичников эндометриоидными кистами и большим размером кисты (более 6 см).

### 3.2 Состояние ОР женщин репродуктивного возраста после оперативного лечения по поводу ЭКЯ

В послеоперационном периоде (через 3 и 6 месяцев) у всех 136 пациентов была проведена оценка ОР на основании исследования уровня АМГ, ФСГ сыворотки крови, объема яичников и количества антральных фолликулов. Следует отметить, что после хирургического лечения уровень АМГ в сыворотке крови был ниже у всех 136 женщин, по сравнению с предоперационным уровнем. Через 3 месяца после операции средний уровень АМГ сыворотки крови в I группе

пациентов составил  $2,57 \pm 1,83$  нг/мл, во II группе  $0,40 \pm 0,29$  нг/мл,  $p = 0,000001$ . Средние значения ФСГ при этом были следующими:  $7,42 \pm 2,88$  МЕ/л в I группе и  $10,87 \pm 1,85$  МЕ/л во II группе женщин,  $p = 0,000001$ . Через 6 месяцев после оперативного лечения в I группе женщин средний уровень АМГ сыворотки крови был  $2,44 \pm 1,79$  нг/мл, во II группе -  $0,67 \pm 0,36$  нг/мл,  $p = 0,000001$ . Средний уровень ФСГ составил  $8,05 \pm 2,70$  МЕ/л и  $11,25 \pm 2,32$  МЕ/л в I и во II группах соответственно,  $p = 0,000004$  (Рисунок 15).

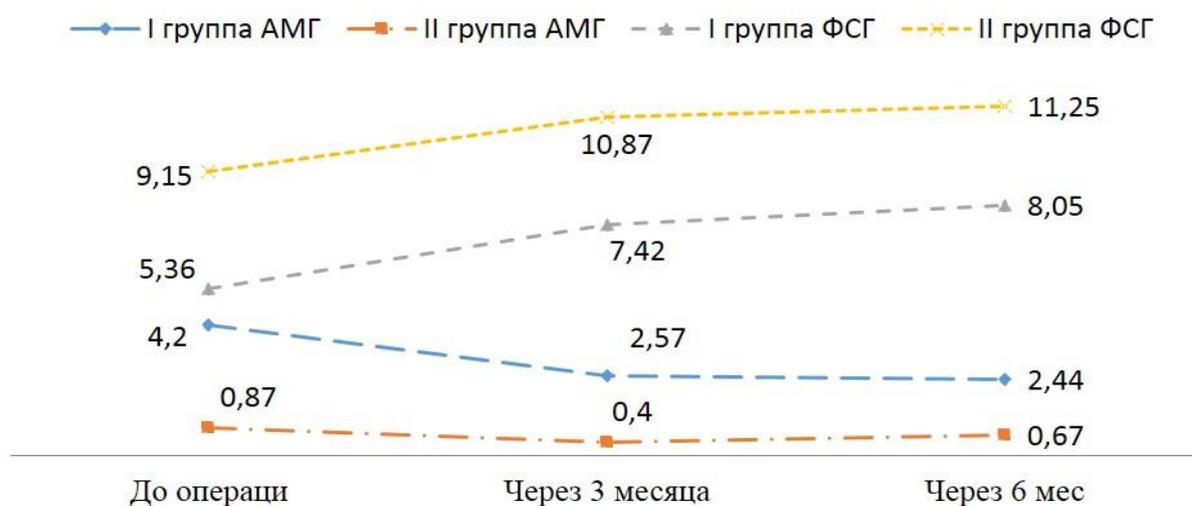


Рисунок 15 - Динамика уровня АМГ и ФСГ в группах.

В послеоперационном периоде (через 3 и 6 месяцев) проводилась ультразвуковая оценка состояния яичников. Определялся объем яичников и подсчитывалось количество антральных фолликулов (Таблица 11).

Таблица 11 - УЗИ – характеристика яичников в послеоперационном периоде

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=136)		$\chi^2/p$
	I группа, пациенты с нормальным ОР (n=87)	II группа, пациенты с низким ОР (n=49)	
<b>Через 3 месяца после операции</b>			
Объем яичников менее $3 \text{ см}^3$	27 (30%)	33 (67,3%)	16,765/0,00006**
Объем яичников более $3 \text{ см}^3$	60 (70%)	16 (32,7%)	

Продолжение таблицы 11

Количество антральных фолликулов менее 5	23 (26,4%)	41 (83,7%)	41,218/0,000001**
Количество антральных фолликулов более 5	64 (73,6%)	8 (16,3%)	
<b>Через 6 месяцев после операции</b>			
Объем яичников менее 3 см <sup>3</sup>	26 (29,9%)	37 (75,5%)	26,242/0,000001**
Объем яичников более 3 см <sup>3</sup>	61 (70,1%)	12 (24,5%)	
Количество антральных фолликулов менее 5	25 (28,7%)	41 (83,7%)	37,875/0,000001**
Количество антральных фолликулов более 5	62 (71,3%)	8 (16,3%)	

\*\* -  $p < 0,001$

В I группе пациенток до операции по данным УЗИ количество антральных фолликулов менее 5 было зарегистрировано у 12 женщин (13,8%). Через 3 месяца после операции в I группе пациенток количество антральных фолликулов менее 5 зарегистрировано у 23 женщин (26,4%), через 6 месяцев после операции у 25 женщин (28,7%). При сравнении с исходными данными о количестве антральных фолликулов достоверных отличий выявлено не было,  $p > 0,05$ . Во II группе пациенток до операции количество антральных фолликулов менее 5 было выявлено у 28 женщин (57,1%), через 3 месяца после операции у 41 женщины (83,7%), через 6 месяцев после операции также у 28 женщин (83,7%). Во II группе отличия в количестве антральных фолликулов между исходными данными и в послеоперационном периоде были достоверными,  $p < 0,05$  (Рисунок 16).

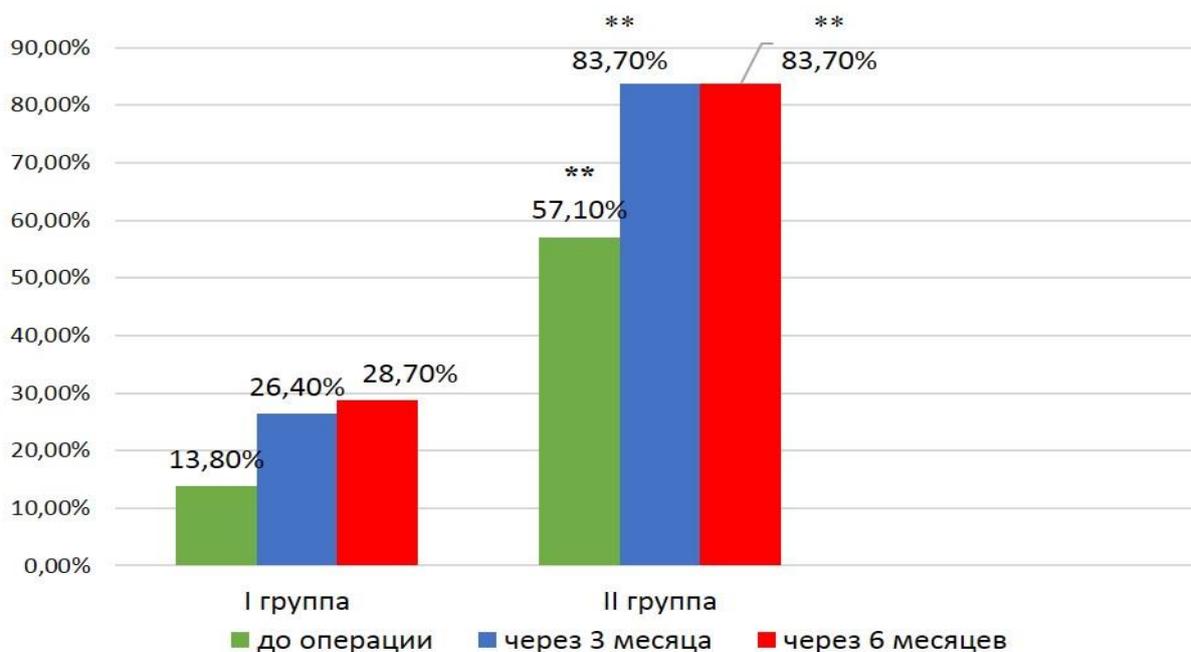


Рисунок 16 - Динамика изменения количества антральных фолликулов в послеоперационном периоде.

Таким образом, при анализе лабораторных и ультразвуковых параметров оценки ОР в послеоперационном периоде было выявлено, что овариальный резерв снижался в 100% случаев как в I группе женщин, так и во II группе женщин. Снижение овариального резерва было отмечено уже через 3 месяца после операции в обеих группах. Наиболее выраженные различия между группами наблюдались в средних уровнях АМГ ( $p < 0,01$ ) и количестве антральных фолликулов по данным УЗИ органов малого таза ( $p < 0,01$ ). При этом следует отметить, что при сравнении с исходными данными различия в количестве антральных фолликулов в I группе пациентов не были статистически достоверными.

Следует отметить, что в I группе через 3 месяца после хирургического лечения 17 женщин (19,5%) имели низкий ОР (АМГ  $< 1,0$  нг/мл), у 70 пациентов (80,5%) сохранился нормальный ОР. Через 6 месяцев после операции низкий ОР в I группе был у 18 женщин (20,7%), нормальный овариальный резерв - у 69 пациенток (79,3%) (Рисунок 17).



Рисунок 17 - Состояние овариального резерва в I группе пациенток в послеоперационном периоде.

Таким образом, динамика уровня АМГ позволила нам в послеоперационном периоде выделить следующие подгруппы в I группе женщин: через 3 месяца после хирургического лечения подгруппа Ia<sub>3</sub> (низкий овариальный резерв после операции, n = 17) и подгруппа Ib<sub>3</sub> (нормальный овариальный резерв после операции, n = 70); через 6 месяцев после операции подгруппа Ia<sub>6</sub> (низкий овариальный резерв после операции, n = 18) и подгруппа Ib<sub>6</sub> (нормальный овариальный резерв после операции, n = 69).

Нами был произведен сравнительный анализ уровня АМГ и ФСГ в подгруппах Ia<sub>3</sub> и Ib<sub>3</sub> через три месяца после операции, а также оценка состояния яичников по данным УЗИ. Через 3 месяца наблюдения в послеоперационном периоде средний уровень АМГ в Ia<sub>3</sub> подгруппе составил  $0,93 \pm 0,15$  нг/мл, в подгруппе Ib<sub>3</sub> –  $3,13 \pm 1,81$  нг/мл,  $p = 0,000001$ . Средний уровень ФСГ до операции в подгруппе Ia<sub>3</sub> был  $6,95 \pm 3,99$  МЕ/л, в подгруппе Ib<sub>3</sub> составил  $4,54 \pm 2,36$  МЕ/л,  $p = 0,039$ . Через 3 месяца после операции средний уровень ФСГ был  $9,53 \pm 2,26$  МЕ/л и  $5,31 \pm 1,76$  МЕ/л в Ia<sub>3</sub> и Ib<sub>3</sub> подгруппе соответственно,  $p = 0,000001$ . При оценке ультразвуковых критериев ОР выявлено низкое количество антральных фолликулов в 94,1% случаев в Ia<sub>3</sub> подгруппе и в 10% случаев в Ib<sub>3</sub> подгруппе,  $p < 0,001$ . Объем яичников менее 3 см<sup>3</sup> составил 76,5% случаев в Ia<sub>3</sub> подгруппе и 20%

случаев в Ib<sub>3</sub> подгруппе,  $p < 0,001$ . Различия по данным критериям также явились статистически достоверными, представлены в Таблице 12.

Таблица 12 - Состояние овариального резерва в I группе через 3 месяца после операции

Показатель	I группа пациентов с ЭКЯ через 3 месяца после операции (n=87)		$\chi^2/p$
	Ia <sub>3</sub> подгруппа, пациенты с низким ОР (n=17)	Ib <sub>3</sub> подгруппа, пациенты с нормальным ОР (n=70)	
<b>Уровень АМГ (нг/мл)</b>			
До операции	2,92±1,80	4,75±2,26	0,000779**
Через 3 месяца после операции	0,93±0,15	3,13±1,81	0,000001**
<b>Уровень ФСГ (МЕ/л)</b>			
До операции	6,95±3,99	4,54±2,36	0,03929*
Через 3 месяца после операции	9,53±2,26	5,31±1,76	0,000001**
<b>Объем яичников менее 3 см<sup>3</sup></b>			
Через 3 месяца после операции	13 (76,5%)	14 (20%)	20,380/0,00002**
<b>Количество антральных фолликулов менее 5</b>			
До операции	10 (58,8%)	2 (2,9%)	36,031/0,00001**
Через 3 месяца после операции	16 (94,1%)	7 (10%)	49,766/0,00001**

\*- $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

Статистический анализ выявил существенные различия между данными подгруппами в уровне АМГ до хирургического лечения, количестве женщин подвергшихся двусторонней резекции яичников, диаметре ЭКЯ, а также наличия операций на яичниках в анамнезе, рецидива данной кисты и стадии распространения процесса. При оценке динамики уровня гормонов выявлено, что в подгруппе низкого ОР через 3 месяца после операции (Ia<sub>3</sub> подгруппа) изначально показатель АМГ составил 2,92±1,80 нг/мл. Различия в уровне АМГ до операции и через 3 месяца после операции явились статистически значимы,  $p < 0,001$ . При этом

в Ib<sub>3</sub> подгруппе, где ОР оставался в пределах нормы через 3 месяца после операции, изначальный уровень АМГ составил  $4,75 \pm 2,26$  нг/мл. по сравнению с уровнем АМГ через 3 месяца после операции  $3,13 \pm 1,81$  нг/мл,  $p < 0,001$  (Рисунок 18).

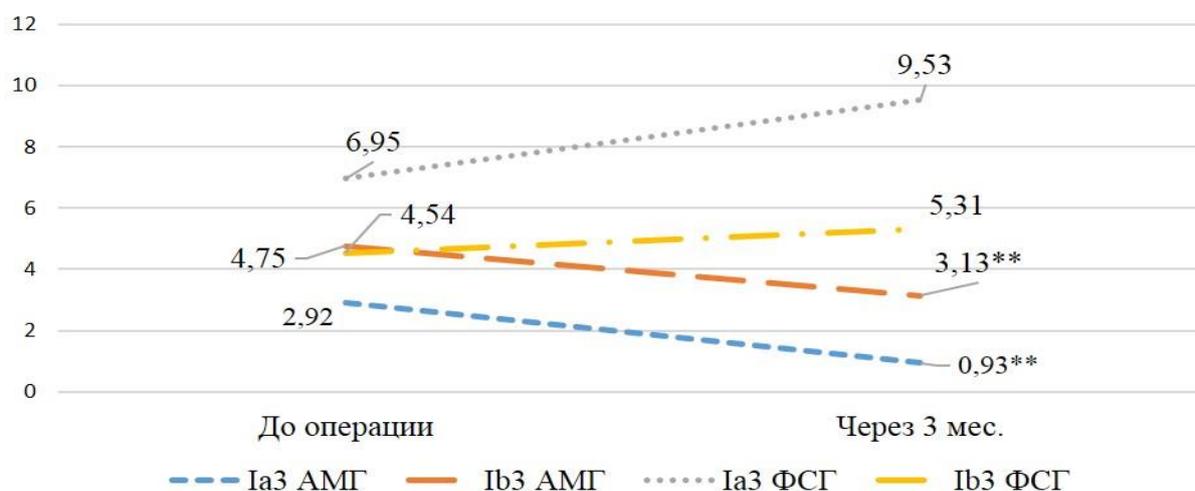


Рисунок 18 - Динамика уровня АМГ и ФСГ в Ia<sub>3</sub> и Ib<sub>3</sub> подгруппах.

Также в подгруппе Ia<sub>3</sub> до операции больше чем у половины пациенток (58,8%) по данным УЗИ количество антральных фолликулов было менее 5. Эти данные позволили нам сделать вывод, что при изначально не высоком уровне АМГ (в пределах 2,92 нг/мл) в сочетании с малым количеством антральных фолликулов по УЗИ возможно ожидать снижение ОР уже через 3 месяца после операции,  $p < 0,001$ .

Нами была произведена оценка факторов риска снижения овариального резерва в послеоперационном периоде у женщин с изначально нормальным ОР (Таблица 13). Следует отметить, что наиболее значимым фактором, влияющим на снижение ОР после хирургического лечения, явилась двусторонняя резекция яичников и степень распространения процесса. Так, в Ia<sub>3</sub> подгруппе двусторонней резекции яичников (по поводу эндометриоидных кист) подверглись 14 женщин, что составило 82,4%, в то время как в подгруппе Ib<sub>3</sub> двустороннюю резекцию яичников перенесли 6 пациентов (8,6%),  $p < 0,001$ . 3 – 4 стадия распространения процесса встречалась 12 женщин (70,6%) в Ia<sub>3</sub> подгруппе и у 17 женщин (24,3%) в Ib<sub>3</sub> подгруппе,  $p < 0,001$ . Размеры удаленной кисты также влияли на снижение

овариального резерва в послеоперационном периоде. Так, диаметр удаленной ЭКЯ был более 4-х см у 14 пациенток (82,4%) в Ia<sub>3</sub> подгруппе и у 30 пациенток (42,9%) в Ib<sub>3</sub> подгруппе, ( $p < 0,05$ ). Нами не было установлено статистически значимого влияния на ОР в послеоперационном периоде возраста пациенток на момент операции и наличия в анамнезе оперативных вмешательств на яичниках. Средний возраст пациенток Ia<sub>3</sub> подгруппы составил  $30,59 \pm 1,80$  лет, Ib<sub>3</sub> подгруппы  $29,33 \pm 3,78$  лет,  $p = 0,23$ . Операции на яичниках в анамнезе были у 4 женщин (23,55%) случаев в Ia<sub>3</sub> подгруппе и у 5 женщин (5,7%) в Ib<sub>3</sub> подгруппе, ( $p > 0,05$ ).

Таблица 13 - Клиническая характеристика пациенток I группы через 3 месяца после операции

Показатель	I группа пациентов с ЭКЯ через 3 месяца после операции (n=87)		$\chi^2/p$
	Ia <sub>3</sub> подгруппа, пациенты с низким ОР (n=17)	Ib <sub>3</sub> подгруппа, пациенты с нормальным ОР (n=70)	
Средний возраст на момент операции (лет)	30,59±3,76	29,33±3,78	0,23
Операции на яичниках в анамнезе	4 (23,5%)	5 (7,1%)	3,960/0,0686
Рецидив эндометриoidной кисты	4 (23,5%)	1 (1,4%)	12,334/0,00468*
Двусторонняя резекция яичников	14 (82,4%)	6 (8,6%)	42,059/0,000001**
Диаметр кист более 4 см	14 (82,4%)	30 (42,9%)	8,536/0,00574*
1 – 2 стадия распространения процесса	5 (29,4%)	53 (75,7%)	13,196/0,00094**
3 – 4 стадия распространения процесса	12 (70,6%)	17 (24,3%)	

\*-  $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

Через 6 месяцев после операции при оценке ОР было выявлено, что в Ia<sub>3</sub> подгруппе (низкий ОР через 3 месяца после операции,  $n = 17$ ) нормальный ОР имели 5 пациентов (29,4%), сниженным ОР оставался у 12 пациентов (70,6%). В Ib<sub>3</sub>

подгруппе (нормальный ОР через 3 месяца после операции,  $n = 70$ ) 64 женщин (91,4%) имели нормальный ОР и 6 женщин (8,6%) – низкий овариальный резерв. В итоге через 6 месяцев после операции в I группе пациентов ( $n = 87$ ) низким ОР был у 18 женщин (20,7%), нормальным - у 69 женщин (79,3%). Таким образом, через 6 месяцев после операции все 87 пациенток из группы нормального ОР до операции были разделены на две подгруппы: Ia<sub>6</sub> подгрупп (n = 18) – низкий ОР и Ib<sub>6</sub> подгруппа (n = 69) – нормальный ОР, (Рисунок 19).

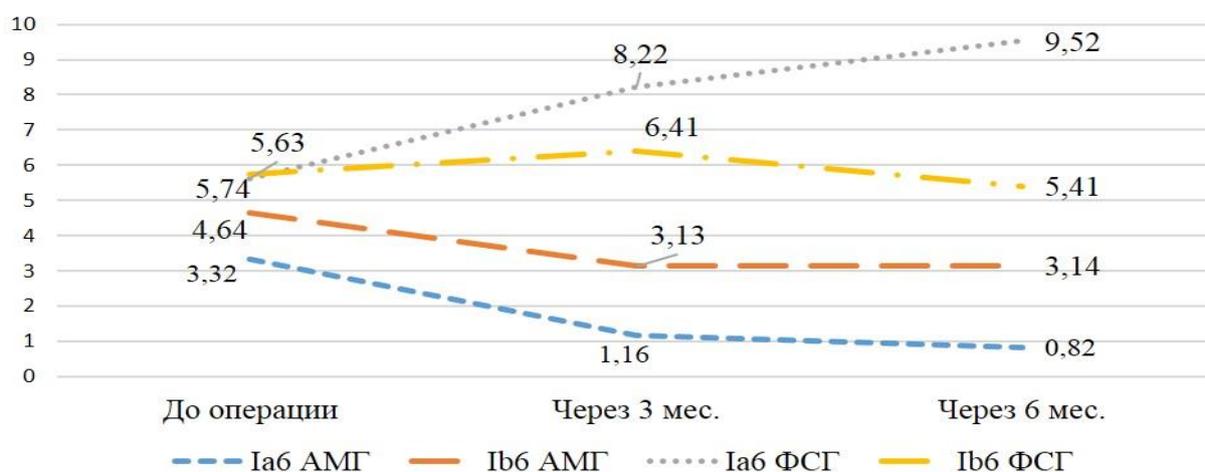


Рисунок 19 - Динамика уровня АМГ и ФСГ в Ia<sub>6</sub> и Ib<sub>6</sub> подгруппах.

Средний уровень АМГ до операции в Ia<sub>6</sub> подгруппе составил  $3,32 \pm 2,16$  нг/мл, в Ib<sub>6</sub> подгруппе –  $4,64 \pm 2,25$  нг/мл,  $p = 0,0315$ . В послеоперационном периоде через 3 месяца были зарегистрированы следующие средние значения АМГ: в Ia<sub>6</sub> подгруппе  $1,16 \pm 0,55$  нг/мл, в Ib<sub>6</sub> подгруппе –  $3,13 \pm 1,87$  нг/мл,  $p = 0,000001$ . Через 6 месяцев средний уровень АМГ в Ia<sub>6</sub> подгруппе явился  $0,82 \pm 0,29$  нг/мл, по сравнению с  $3,14 \pm 1,76$  нг/мл в Ib<sub>6</sub> подгруппе,  $p = 0,000001$ . Уровень ФСГ до операции был  $5,63 \pm 2,39$  МЕ/л и  $5,74 \pm 3,99$  МЕ/л, через 3 месяца после операции  $8,22 \pm 3,03$  МЕ/л и  $6,41 \pm 2,36$  МЕ/л, через 6 месяцев после операции составил  $9,52 \pm 1,84$  МЕ/л и  $5,41 \pm 1,87$  МЕ/л в Ia<sub>6</sub> и в Ib<sub>6</sub> подгруппах соответственно (Таблица 14). Достоверные различия по уровню ФСГ в данных подгруппах наблюдались только через 6 месяцев после операции,  $p = 0,000015$ . Объем яичников менее  $3 \text{ см}^3$  был в 94,4% случаев в Ia<sub>6</sub> подгруппе и в 13% в Ib<sub>6</sub> подгруппе, сниженное число

антральных фолликулов зафиксировано в 94,4% и в 11,6% случаев в Ia<sub>6</sub> и в Ib<sub>6</sub> подгруппах соответственно ( $p < 0,01$ ).

Таблица 14 - Состояние овариального резерва в I группе через 6 месяцев после операции

Показатель	I группа пациентов с ЭКЯ через 6 месяца после операции (n=87)		$\chi^2/p$
	Ia <sub>6</sub> подгруппа, пациенты с низким ОР (n=18)	Ib <sub>6</sub> подгруппа, пациенты с нормальным ОР (n=69)	
<b>Уровень АМГ (нг/мл)</b>			
До операции	3,32±2,16	4,64±2,25	0,031570*
Через 3 месяца после операции	1,16±0,55	3,13±1,87	0,000001**
Через 6 месяцев после операции	0,82±0,29	3,14±1,76	0,000001**
<b>Уровень ФСГ (МЕ/л)</b>			
До операции	5,63±2,39	5,74±3,99	0,1
Через 3 месяца после операции	8,22±3,03	6,41±2,36	0,05
Через 6 месяцев после операции	9,52±1,84	5,41±1,87	0,000001**
<b>Объем яичников менее 3 см<sup>3</sup></b>			
Через 3 месяца после операции	13 (72,2%)	14 (20,3%)	17,989/0,00006**
Через 6 месяцев после операции	17 (94,4%)	9 (13%)	45,144/0,00001**
<b>Количество антральных фолликулов менее 5</b>			
До операции	10 (58,8%)	2 (2,9%)	33,290/0,00001**
Через 3 месяца после операции	16 (88,9%)	7 (10,1%)	45,516/0,00001**
Через 6 месяцев после операции	17 (94,4%)	8 (11,6%)	47,852/0,00000**

\*-  $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

Также, нами через 6 месяцев после хирургического лечения произведена оценка факторов риска снижения овариального резерва (Таблица 15). Двусторонняя резекция яичников по поводу эндометриоидной кисты была

проведена в 88,9% случаев (16 человек) в Ia<sub>6</sub> подгруппе и в 5,8% случаев (4 человека) Ib<sub>6</sub> подгруппе,  $p < 0,05$ . Диаметр кисты более 4 – х см был в 83,3% случаев (15 человек) в Ia<sub>6</sub> подгруппе и в 42% случаев (29 человек) в Ib<sub>6</sub> подгруппе,  $p < 0,05$ . Стадия распространения процесс в Ia<sub>6</sub> подгруппе в 66,7% случаев была 3 – 4, по сравнению с 24,6% в Ib<sub>6</sub> подгруппе,  $p < 0,05$ .

Таблица 15 - Факторы риска снижения овариального резерва у пациенток I группы через 6 месяцев после операции

Показатель	I группа пациентов с ЭКЯ через 3 месяца после операции (n=87)		$\chi^2/p$
	Ia <sub>6</sub> подгруппа, пациенты с низким ОР (n=18)	Ib <sub>6</sub> подгруппа, пациенты с нормальным ОР (n=69)	
Двусторонняя резекция яичников	16 (88,9%)	4 (5,8%)	55,674/0,000001**
Диаметр кист более 4 см	15 (83,3%)	29 (42%)	9,743/0,00287*
3 – 4 стадия распространения процесса	12 (66,7%)	17 (24,6%)	11,348/0,00151*

\*-  $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,001$

Таким образом, двусторонняя резекция яичников, степень распространения эндометриоза, диаметр эндометриоидных кист  $> 4$  см, а также предоперационный уровень АМГ и количество антральных фолликулов, явились статистически значимыми факторами, влияющими на развитие низкого овариального резерва как через 3 месяца, так и через 6 месяцев после операции.

### 3.3 Анализ репродуктивной функции женщин репродуктивного возраста после операции по поводу ЭКЯ

Из 136 пациенток, включенных в исследование, 115 женщин были заинтересованы в реализации репродуктивной функции. После операции 76 женщин из I группы и 39 пациенток из II группы пытались забеременеть. Учитывая репродуктивные планы пациенток, женщины, которые желали реализовать репродуктивную функцию были направлены на консультацию к репродуктологу

для решения вопроса о возможности наступления самостоятельной беременности или необходимости включения в программу ВРТ. Пациенткам из I группы (11 человек), не планирующим беременность, в послеоперационном периоде с целью профилактики рецидивирования ЭКЯ были назначены аГнРг коротким курсом на 2 – 3 месяца.

После операции из 115 пациенток, пытавшихся реализовать репродуктивную функцию, беременность наступила у 42 (36,5%). При этом в I группе беременность наступила у 35 (46,1%) из 76 женщин. Во II группе беременность наступила у 7 (17,9%) из 39 женщин. Различия между группами по частоте наступления беременности после оперативного лечения ЭКЯ являются достоверными,  $p = 0,004$  (Рисунок 20).

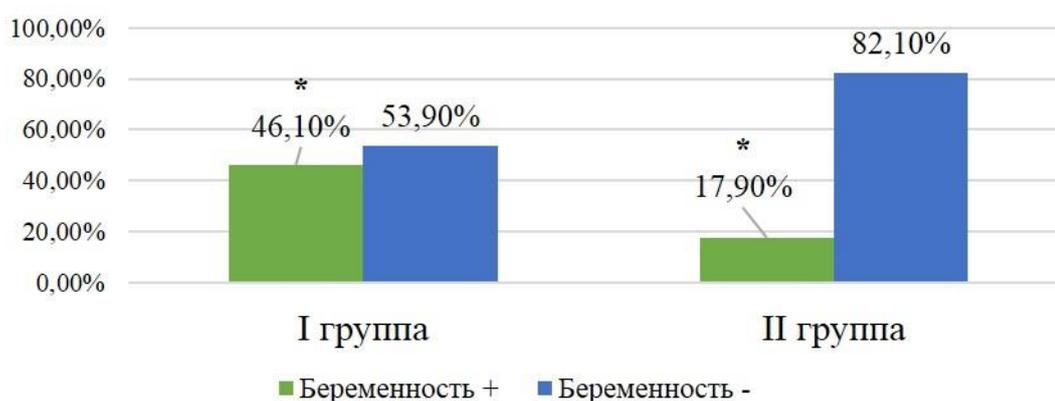


Рисунок 20 - Частота наступления беременности в группах после операции.

Самостоятельно беременность наступила у 25 пациенток (32,9%) из I группы и у 2 пациенток (5,1%) из II группы,  $p = 0,00085$ . С помощью ВРТ беременность наступила у 10 женщин (13,2%) в I группе и 5 женщин (12,8%) во II группе,  $p = 0,960$  (Рисунок 21). Следует отметить, что 7 пациенток (18%) из II группы также прибегали к программе ЭКО, но учитывая отсутствие ответа яичников на гормональную стимуляцию, забор ооцитов не проводился.

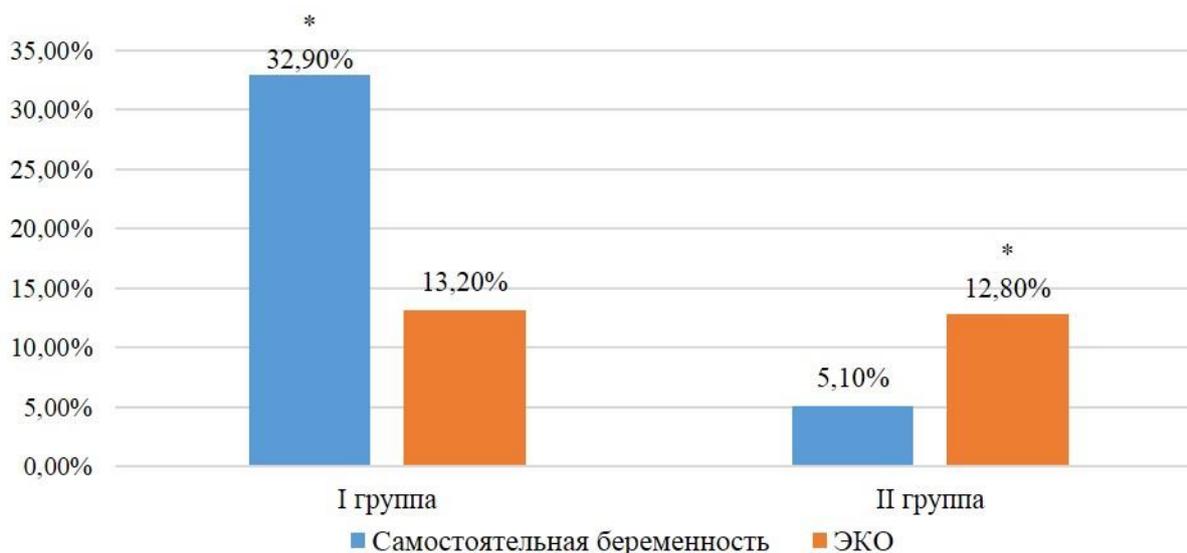


Рисунок 21 - Частота наступления беременности самостоятельно и с помощью ЭКО в группах.

Средний возраст женщин обеих групп, которые забеременели самостоятельно ( $n = 27$ ), составил  $29,6 \pm 2,85$  лет. Беременность наступила через  $8,55 \pm 1,70$  месяцев после операции. Среди данных пациенток односторонняя резекция яичников по поводу эндометриоидной кисты была проведена в 85,2% случаев (23 женщины), двусторонняя резекция яичников в 14,8% случаев (4 женщины). В 53,8% случаев размеры удаленных эндометриоидных кист были более 4 см. Средний уровень АМГ у данных женщин до операции составил  $5,05 \pm 2,16$  нг/мл. Через 3 и 6 месяцев после операции нормальным (АМГ более 1,1 нг/мл) овариальный резерв оставался у 24 женщин (88,9%), у 3-х женщин (11,1%) был низким. Средний уровень АМГ через 6 месяцев после операции в данной группе женщин составил  $3,35 \pm 1,59$  нг/мл.

При анализе репродуктивных исходов было установлено, что в I группе пациенток беременность, которая наступила самостоятельно, завершилась родами у всех 25 женщин (32,9%). Во II группе самостоятельная беременность завершилась родами у 1 женщины (2,6%) и неразвивающейся на сроке 7 – 8 недель была также у 1 пациентки (2,6%). Исходы ЭКО в I группе следующие: пролонгирование беременности до доношенного срока и родоразрешение у 7 женщин (9,2%); у 1 пациентки (1,3%) выявлено отсутствие дробления эмбрионов; у 2 женщин (2,6%)

после переноса эмбриона в полость матки беременность не наступила. Исходы ЭКО во II группе были следующими: пролонгирование беременности до доношенного срока и родоразрешение у 1 женщины (2,6%), у 2 (5,1%) неразвивающаяся беременность на сроке 7 недель; у 2 пациенток (5,1%) отсутствовал процесс дробления эмбрионов (Таблица 16).

Таблица 16 – Репродуктивные исходы

Показатель	115 женщин, пытавшихся реализовать репродуктивную функцию	
	I группа (n=76)	II группа (n=39)
<b>Беременность, наступившая самостоятельно</b>		
Роды	25 (32,9%)	1 (2,6%)
Неразвивающаяся беременность	0	1 (2,6%)
<b>Беременность, наступившая с помощью ЭКО</b>		
Роды	7 (9,2%)	1 (2,6%)
Неразвивающаяся беременность	0	2 (5,1%)
Отсутствие развития эмбрионов после переноса в полость матки	2 (2,6%)	0
Отсутствие дробления эмбрионов	1 (1,3%)	2 (5,1%)

Таким образом, анализ репродуктивной функции и исходов беременностей показал, что после операции по поводу ЭКЯ из 115 женщин, пытавшихся реализовать репродуктивную функцию беременность наступила у 42 женщин (36,5%), самостоятельно забеременели 27 пациенток (23,5%), с помощью ЭКО беременность наступила у 15 женщин (13%). Беременность завершилась родами у 34 (81%) из 42 женщин, неудачи были у 8 (19%) из 42 пациенток. В общей сложности из 115 женщин беременность завершилась родами у 34 женщин (29,5%) и неудачные попытки беременности были у 81 пациентки (70,5%).

Результаты проведенного нами исследования показали, что у женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ в 36% случаев определяется низкий ОР еще до оперативного лечения. Факторами, коррелирующими с низким ОР до операции,

являются старший возраст пациенток, двусторонние ЭКЯ, III – IV стадия распространения процесса, оперативное вмешательство на яичниках в анамнезе, рецидивирование эндометриoidных кист. Также негативно на ОР сказывается длительность существования эндометриоза, задержки в постановке диагноза. В послеоперационном периоде ОР снижается у всех пациенток. Низким ОР в послеоперационном периоде становится в 21% случаев. Особенно негативно на состоянии ОР в послеоперационном периоде влияют двусторонняя резекция яичников, удаление кист большого диаметра. Исходно низкие уровни АМГ и малое количество антральных фолликулов до операции является прогностическим критерием снижения ОР в послеоперационном периоде. В послеоперационном периоде показатели наступления беременности остаются низкими (36,5%), доля неудачных попыток беременности составляет 70,5%.

#### **3.4. Исследование экспрессии мкРНК в тканях эндометрия при низком и нормальном овариальном резерве**

С целью установления патогенетических механизмов развития эндометриоза и его влияния на овариальный резерв нами был произведен анализ экспрессии микроРНК в тканях эндометриoidной кисты (Ec) и эутопического эндометрия (Eu) пациенток из группы исходно нормального (N) и исходно низкого (L) ОР. Сравнение экспрессии мкРНК производилось как между тканями внутри каждой группы, так и между группами с различным ОР. В данное исследование вошли 16 женщин – 8 из группы нормального ОР и 8 из группы низкого ОР. Клиническая характеристика пациенток представлена в Таблице 17.

Таблица 17 – Клиническая характеристика пациенток, включенных в исследование экспрессии уровня мкРНК

Показатель	Все пациенты с ЭКЯ (n=16)		p
	I группа, пациенты с нормальным ОР до операции (n=8)	II группа, пациенты с низким ОР до операции (n=8)	
Средний возраст пациенток (лет)	29,13 ± 4,32	34,25 ± 2,25	0,015*
Рецидив ЭКЯ	1 (12,5%)	2 (25%)	0,410
Односторонние ЭКЯ	7 (87,5%)	4 (50%)	0,106
Двусторонние ЭКЯ	1 (12,5%)	4 (50%)	
Диаметр ЭКЯ менее 4х см.	3 (37,5%)	3 (37,5%)	1
Диаметр ЭКЯ более 4х см.	5 (62,5%)	5 (62,5%)	
Средний диаметр ЭКЯ (см)	4,88 ± 2,28	8,63 ± 6,52	0,174
Стадия распространения эндометриоза I - II	6 (75%)	3 (37,5%)	0,131
Стадия распространения эндометриоза III - IV	2 (25%)	5 (62,5%)	

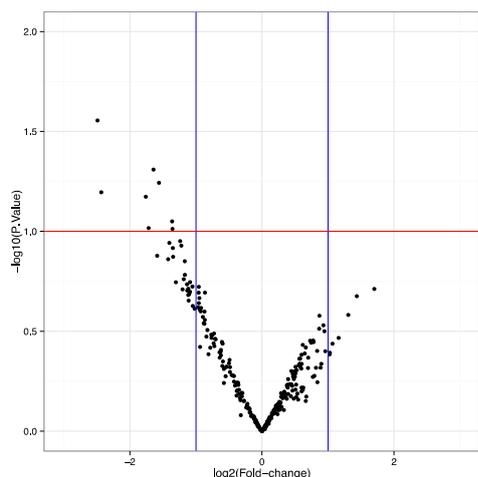
\*-  $p < 0,05$

Статистические достоверные различия между группами были только в возрасте пациенток, в I группе средний возраст составил  $29,13 \pm 4,32$  лет, во II группе -  $34,25 \pm 2,25$  лет,  $p = 0,015$ . Остальные клинические показатели не имели статистически достоверного различия. Однако, рецидив эндометриоидной кисты, двусторонние ЭКЯ и III – IV стадия распространения эндометриоза в два раза чаще встречались в группе низкого овариального резерва. Средний диаметр ЭКЯ в группе низкого ОР был  $8,63 \pm 6,52$  по сравнению с  $4,88 \pm 2,28$  в группе

нормального ОР. Таким образом, количество факторов риска, ассоциированных с низким ОР было больше представлено во II группе.

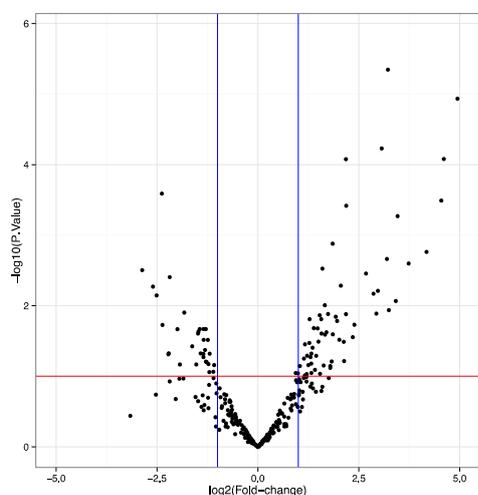
Анализ экспрессии мкРНК в биоптатах ЭКЯ и эндометрия пациенток группы с исходно низким ОР выявил 15 дифференциально экспрессируемых мкРНК с пониженной экспрессией в тканях эндометриоидной кисты (EcL) относительно эутопического эндометрия (EuL), (Рисунок 22а). При анализе экспрессии мкРНК в тканях ЭКЯ и эндометрия пациенток группы нормального овариального резерва было выявлено 100 дифференциально экспрессирующихся мкРНК, среди которых 66 демонстрировали повышенную, а 34 сниженную экспрессию в тканях эндометриоидной кисты яичника (EcN) относительно эутопического эндометрия (EuN), (Рисунок 22б). Значительное отличие в количестве дифференциально экспрессированных мкРНК (дэ-мкРНК) свидетельствует о существенном дисбалансе регуляторных процессов в тканях ЭКЯ и эндометрия при различных типах ОР. Пересечение полученных списков дэ-мкРНК при низком и нормальном резерве выявило три мкРНК (hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-615-3p), характерных только для низкого резерва, и 12 одинаковых мкРНК: hsa-miR-1-3p, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-202-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-514a-3p, hsa-miR-708-5p. При этом экспрессия одинаковых для групп сравнения мкРНК имела разнонаправленный характер: снижалась при низком, и повышалась при нормальном резерве.

## а. EcL-EuL



мкРНК	log2FC	p-value	мкРНК	log2FC	p-value
hsa-miR-202-5p	-9,6	7,5E-08	hsa-miR-615-3p	-2,4	6,4E-02
hsa-miR-129-2-3p	-7,0	1,8E-04	hsa-miR-708-5p	-1,8	6,7E-02
hsa-miR-129-5p	-6,2	3,7E-05	hsa-miR-29c-5p	-1,7	9,6E-02
hsa-miR-1-3p	-4,9	1,9E-04	hsa-miR-29b-3p	-1,6	4,9E-02
hsa-miR-514a-3p	-4,3	8,7E-04	hsa-miR-127-5p	-1,6	5,7E-02
hsa-miR-509-3-5p	-3,4	5,4E-03	hsa-miR-136-3p	-1,4	8,9E-02
hsa-miR-508-3p	-3,2	8,0E-03	hsa-miR-145-5p	-1,4	9,7E-02
hsa-miR-29c-3p	-2,5	2,8E-02			

## б. EcN-EuN



Повышенная экспрессия			Пониженная экспрессия		
мкРНК	log2FC	p-value	мкРНК	log2FC	p-value
hsa-miR-202-5p	9,1	1,9E-05	hsa-miR-451a	-2,6	5,4E-03
hsa-miR-514a-3p	6,4	8,4E-07	hsa-miR-25-3p	-1,3	6,3E-02
hsa-miR-1-3p	4,5	3,2E-04	hsa-miR-92a-3p	-1,3	6,2E-02
hsa-miR-29c-3p	3,5	5,4E-04	hsa-miR-3529-3p	-1,2	6,7E-02
hsa-miR-29b-3p	3,2	4,5E-06	hsa-miR-486-5p	-2,9	3,1E-03
hsa-miR-136-3p	2,7	3,5E-03	hsa-miR-16-5p	-1,3	2,1E-02
hsa-miR-29a-3p	2,2	3,8E-04	hsa-miR-93-5p	-1,5	6,8E-02
hsa-miR-26a-5p	1,9	1,4E-02	hsa-miR-106b-3p	-1,4	2,1E-02
hsa-miR-100-5p	1,7	9,8E-03	hsa-miR-17-5p	-1,3	5,3E-02
hsa-miR-10b-5p	1,6	3,0E-03	hsa-miR-363-3p	-2,2	4,9E-02

Рисунок 22 - Дифференциальная экспрессия мкРНК в эктопическом эндометрии овариальных кист относительно эутопического эндометрия при низком (а) и нормальном (б) ОР. В таблицах представлены 10 мкРНК с повышенной и пониженной экспрессией, отобранные на основании параметров кратности изменений (Log2FC) и вероятности ошибки (p-value).

Разнонаправленный характер экспрессии мкРНК также подтверждается при сравнении результатов секвенирования в эктопическом эндометрии при низком резерве относительно тканей эктопического эндометрия при нормальном резерве (EcL-EcN). При этом в данном сравнении наблюдалось 50 дэ-мкРНК с пониженной экспрессией и 14 мкРНК с повышенной экспрессией в тканях кисты при низком ОР относительно нормального ОР (Рисунок. 23а). Также, в данном сравнении наблюдалось 36 дэ-мкРНК с повышенной и 23 с пониженной экспрессией в эутопическом эндометрии при низком ОР относительно эутопического эндометрия

группы нормального ОР. Было показано, что экспрессия 12 мкРНК, характерных как для группы нормального ОР, так и для группы низкого ОР, значительно снижена в тканях ЭКЯ при низком ОВР (EcL) и повышена в тканях ЭКЯ при нормальном ОР (EcN). Кроме этого, при сравнении экспрессии данных 12 мкРНК в эутопическом эндометрии при разном ОР (EuL-EuN) наблюдалось повышение их уровня в эутопическом эндометрии при низком ОР и снижение при нормальном ОР (Рисунок 23б).

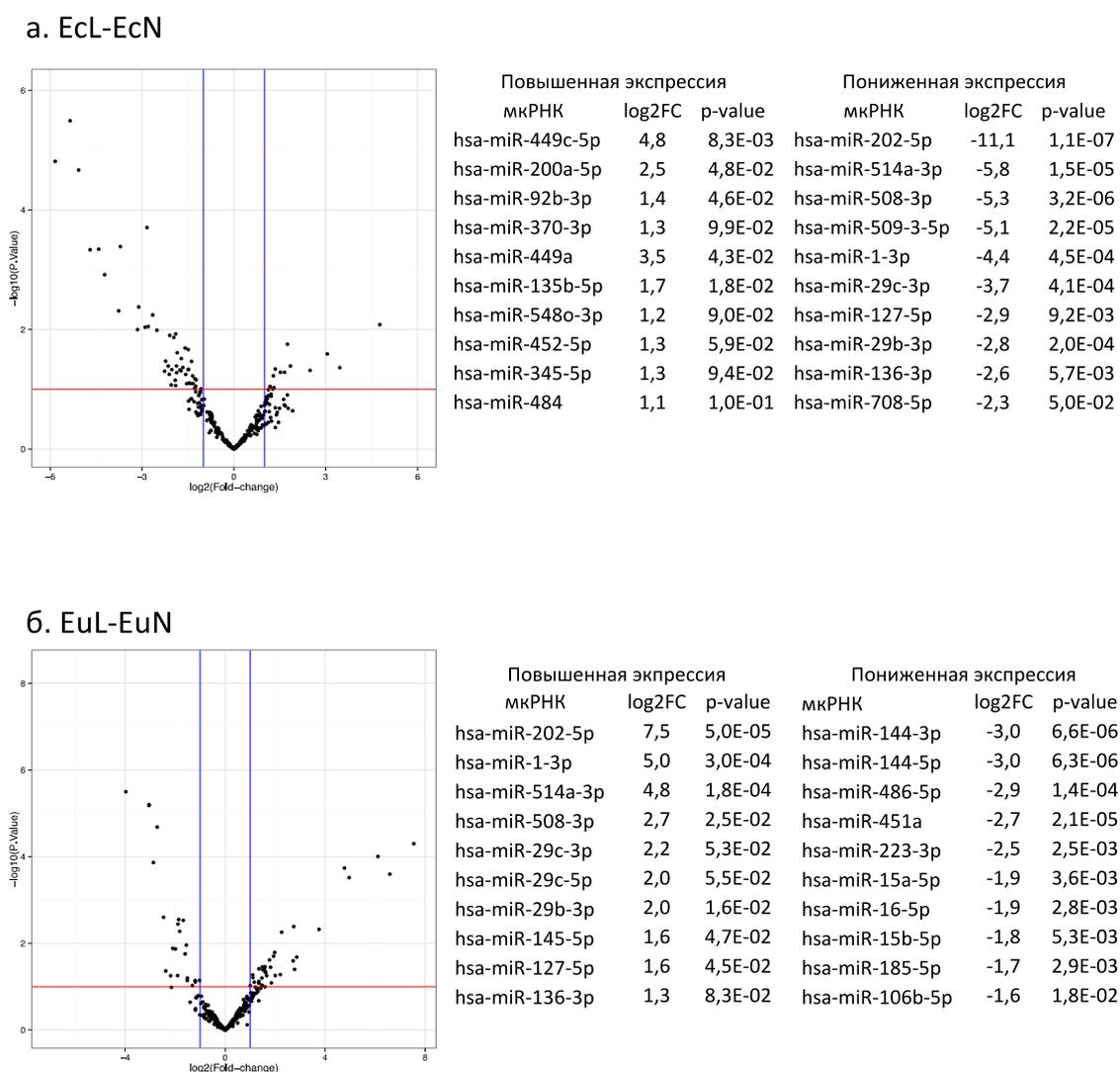


Рисунок 23 - Дифференциальная экспрессия мкРНК в эктопическом (а) и эутопическом (б) эндометрии при низком ОР относительно нормального. В таблицах представлены 10 мкРНК с повышенной и пониженной экспрессией, отобранные на основании параметров кратности изменений (Log2FC) и вероятности ошибки (p-value).

Для подтверждения полученных при секвенировании данных, мы использовали метод ПЦР. Нами был отобран ряд мкРНК на основании количества прочтений и кратности изменений по данным секвенирования в соответствующих образцах. В исследование вошли следующие мкРНК: hsa-miR-1-3p, hsa-miR-514a-3p, hsa-miR-145-5p, has-miR-143-3p, hsa-miR-381-3p. Для всех исследованных мкРНК наблюдался сходный характер изменений экспрессии при сравнении данных, полученных методами секвенирования и ПЦР (Таблица 18).

Таблица 18 - Сравнительный анализ изменения экспрессии микроРНК в группах сравнения методами секвенирования и ПЦР

Группы сравнения	Кратность изм.		Группы сравнения	Кратность изм.	
<b>EcL/EuL</b>	<b>NGS</b>	<b>PCR</b>	<b>EcN/EuN</b>	<b>NGS</b>	<b>PCR</b>
hsa-miR-1-3p	-29,8	-16,0	hsa-miR-1-3p	24,0	5,6
hsa-miR-514a-3p	н/и	н/и	hsa-miR-514a-3p	84,0	н/д
hsa-miR-145-5p	-2,6	-2,1	hsa-miR-145-5p	2,6	2,0
has-miR-143-3p	н/о	н/о	has-miR-143-3p	3,2	2,7
hsa-miR-381-3p	н/о	н/о	hsa-miR-381-3p	н/о	н/о
<b>EuL/EuN</b>	<b>NGS</b>	<b>PCR</b>	<b>EcL/EcN</b>	<b>NGS</b>	<b>PCR</b>
hsa-miR-1-3p	32,0	4,6	hsa-miR-1-3p	-21,1	-19,0
hsa-miR-514a-3p	4,8	н/д	hsa-miR-514a-3p	-55,7	-5,6
hsa-miR-145-5p	3	2,6	hsa-miR-145-5p	-2,1	-1,8
hsa-miR-143-3p	2,9	2,7	has-miR-143-3p	н/о	н/о
hsa-miR-381-3p	3,7	3,0	hsa-miR-381-3p	н/о	н/о

NGS – секвенирование (next generation sequencing)

PCR – ПЦР в реальном времени

Для трех микроРНК hsa-miR-1-3p, -143-3p, -381-3p, выявленных при транскриптомном исследовании, был проведен анализ экспрессии методом ПЦР. Было обнаружено, что для данных микроРНК наблюдается значимое повышение экспрессии в тканях эутопического эндометрия при низком овариальном резерве. Найденные отличия свидетельствуют о том, что данные микроРНК могут служить

потенциальными маркерами низкого овариального в эутопическом эндометрии у пациентов с эндометриозом (Рисунок 24).

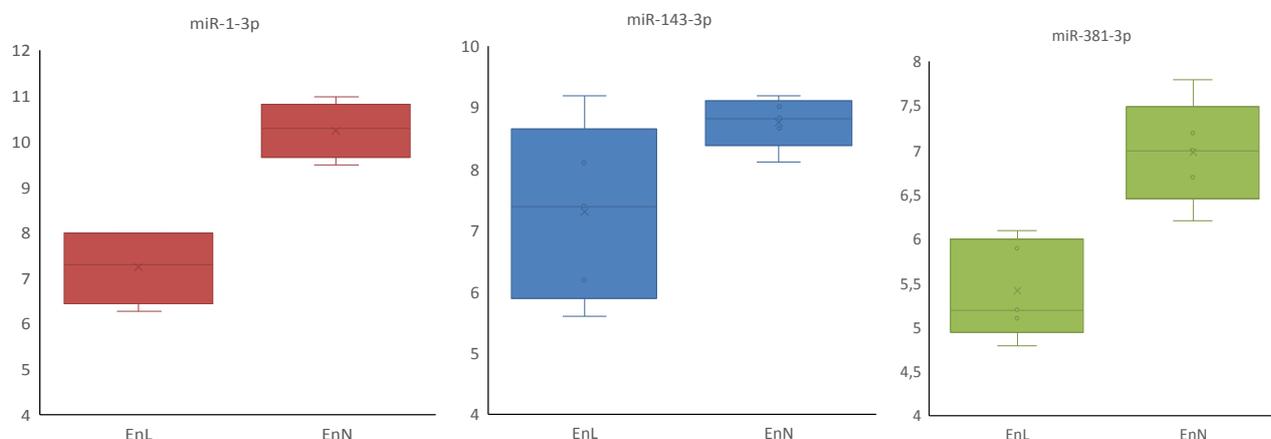


Рисунок 24 - Изменение экспрессии hsa-miR-1-3p, -143-3p, -381-3p в эутопическом эндометрии при низком и нормальном ОР. Экспрессия микроРНК представлена в относительных единицах, полученных в результате вычисления параметра  $\Delta Ct$ .

Таким образом, результаты секвенирования показали достаточно низкое количество дэ-мкРНК в тканях ЭКЯ и эутопического эндометрия в группе низкого овариального резерва, относительно группы ОР. Экспрессия мкРНК в образцах тканей в пределах одной группы имела разнонаправленный характер (снижалась в тканях ЭКЯ и повышалась в эутопическом эндометрии). При сравнительном анализе экспрессии мкРНК в тканях ЭКЯ при разном состоянии ОР, выявлена прямая зависимость количества экспрессирующихся мкРНК от состояния овариального резерва. Так в группе низкого ОР отмечалось снижение экспрессии мкРНК в эктопическом эндометрии относительно уровня экспрессии мкРНК в тканях ЭКЯ в группе нормального ОР. Полученные лабораторные данные о снижении уровня экспрессии мкРНК в тканях эндометриоидной кисты в группе низкого ОР относительно группы нормального ОР пересекаются с клиническими данными о том, что в группе низкого ОР в два раза чаще встречаются двусторонние, рецидивирующие ЭКЯ и III – IV стадия распространения эндометриоза. Как с помощью транскриптомного анализа, так и при ПЦР были выявлены три мкРНК в эутопическом эндометрии, уровень которых был достоверно выше в группе низкого ОР по сравнению с группой нормального ОР. Полученные данные могут

быть использованы в качестве лабораторного маркера снижения овариального резерва.

С целью изучения патогеназа эндометриоза и возможных причин развития низкого ОР при эндометриодных кистах яичников были получены списки валидированных генов-мишеней для дэ-мкРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия. Проведенный анализ выявил двадцать четыре клеточных процесса и сигнальных пути, среди которых особенного внимания заслуживают пути, активируемые эстрогенами, фолликулостимулирующим гормоном, лептином, пролактином, тиреотропином и серотонином. Кроме этого, была выделена группа путей, регулируемых различными интерлейкинами (IL-2,-3,-4,-5,-6,-7,-9), которые могут вносить существенный вклад в воспалительные процессы при развитии эндометриодных гетеротопий. Были также определены клеточные процессы, связанные с канцерогенезом, ангиогенезом и дифференцировкой. Особого внимания заслуживает обогащение по пути регуляции репарации ДНК с участием мкРНК. Активация данного пути может свидетельствовать о повышении уровня повреждений ДНК вследствие развития воспаления и оксидативного стресса в тканях эктопического эндометрия. С данными патологическими процессами, по-видимому, связано выявление пути, ассоциированного с аутофагией и клеточным старением (Таблица 19).

Таблица 19 - Анализ путей и процессов, реализуемых при участии генов-мишеней дифференциально экспрессируемыми мкРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия

Пути/процессы	Ес/Еu N		Ес/Еu L		ЕсL/ЕсN		ЕuL/ЕuN	
	Гены/Путь	q-value	Гены/Путь	q-value	Гены/Путь	q-value	Гены/Путь	q-value
<b>Клеточные процессы</b>								
Adipogenesis	51/104	1,0E-06					47/104	1,0E-06
Angiogenesis	15/23	4,0E-04	7/23	2,3E-03	12/23	8,0E-05	14/23	5,0E-06
Cell cycle					41/95	1,0E-06		
Cell Differentiation - Index	5/10	3,2E-02	3/10	6,0E-02			5/10	2,4E-02
Cell Differentiation - meta	9/16	1,1E-03	6/16	1,8E-03	8/16	2,0E-03	8/16	3,6E-03
DNA damage response (ATM)	40/76	4,2E-05			36/76	9,0E-06	38/76	6,1E-06
Endochondral Ossification	30/61	9,2E-05	15/61	8,1E-05	28/61	3,5E-06	27/61	6,3E-06
Focal Adhesion			45/177	1,3E-03	66/177	4,6E-03		
G1 to S cell cycle control					27/65	2,8E-02		
Integrated Breast Cancer Pathway	67/136	4,7E-05			60/136	2,0E-05	64/136	7,0E-06
Integrated Cancer pathway	22/35	3,2E-04	10/35	4,4E-04	20/35	1,7E-04	23/35	5,1E-05
Neural Crest Differentiation					34/83	1,9E-05		
Osteoblast Signaling	4/10	1,3E-01	4/10	1,0E-02	5/10	1,8E-02	5/10	2,4E-02
Senescence and Autophagy	43/88	2,0E-06	21/88	1,2E-05	39/88	1,7E-05	45/88	
Type II diabetes mellitus	7/16	2,3E-02			5/16	3,7E-02	6/16	5,2E-02
<b>Иммунomodulatory пути</b>								
Inflammatory Response Pathway			9/29	4,5E-04	12/29	9,3E-04		
IL-1 signaling pathway	20/50	2,6E-04						
IL-2 Signaling pathway			10/42	1,5E-03			23/42	9,0E-06
IL-3 Signaling Pathway			7/41	4,4E-02				
IL-4 signaling pathway	26/48	8,0E-05	13/48	1,2E-04			21/48	1,0E-05
IL-5 signaling pathway	22/39	5,2E-05	13/39	1,0E-05	19/39	9,3E-05	21/39	7,6E-06
IL-6 signaling pathway	22/42	3,9E-03						
IL-7 signaling pathway	14/25	4,0E-05	8/25	7,8E-04	12/25	2,0E-04	14/25	2,0E-05
IL-9 signaling pathway	9/16	1,1E-03	4/16	4,7E-02				
<b>Клеточные процессы</b>								
Alpha 6 Beta 4 signaling pathway	17/31	1,0E-05	8/31	2,9E-03			16/31	1,0E-05
Androgen recept signaling pathway	40/83	3,0E-06						
BMP signalling and regulation	6/12	1,9E-02			4/12	1,4E-02		
ErbB signaling pathway					24/54	2,9E-04		
EPO Receptor Signaling	15/26	1,0E-05	7/26	4,5E-03			14/26	3,0E-05
Estrogen signaling pathway	12/19	3,0E-05	9/19	2,0E-05	11/19	5,0E-05	13/19	3,0E-06
FSH signaling pathway	5/27	1,2E-02						
G13 Signaling Pathway	15/36	1,1E-03						
Keap1-Nrf2 Pathway	6/13	2,7E-02			4/13	1,7E-01		
Kit receptor signaling pathway			9/51	1,7E-02				
Leptin signaling pathway	37/61	8,0E-05	14/61	2,5E-04	28/61	1,2E-04	33/61	1,4E-06
miRNAs involved in DDR	12/15	1,0E-07			13/15	1,0E-07	12/15	1,0E-07
Notch Signaling Pathway	27/59	1,3E-02	15/59	1,1E-01	25/59	2,7E-03	25/59	1,6E-02
Osteopontin Signaling	7/11	1,8E-03	4/11	1,4E-02	5/11	2,8E-02		
Prolactin Signaling Pathway	41/75	3,0E-06			32/75	8,2E-06	38/75	4,4E-06
RANKL/RANK Signaling Pathway	26/53	5,3E-05			20/53	7,0E-05	24/53	5,8E-06
Signaling Hepatocyte Growth Factor Receptor			7/33	1,6E-02				
Signal Transduction of S1P Receptor			4/22	1,1E-01				
SREBF (miR33) in cholesterol/lipid homeostasis	11/16	3,0E-05			8/16	2,0E-03	10/16	9,0E-05
TGF Beta Signaling Pathway	29/52	1,7E-05	13/52	2,1E-04	24/52	1,8E-05	26/52	2,1E-05
TP53 network	12/19	3,0E-05	4/19	7,7E-02	10/19	3,0E-04	10/19	3,0E-04
TSH signaling pathway					26/65	2,4E-06	30/65	1,8E-06
TWEAK Signaling Pathway	20/39	2,3E-03					20/39	2,6E-03
Wnt Signaling Pathway					21/52	1,0E-05	21/52	5,0E-05

Ес – эктопический эндометрий, Еu – эутопический эндометрий, N – нормальный ОР, L – низкий ОР.

Гены/Путь – указано количество генов-мишеней дэ-мкРНК в пути (первая цифра) и общее количество генов в пути (вторая цифра), q-value вероятность ошибки в формировании пути.

### 3.5. Транскриптомный анализ экспрессии генов в тканях эндометрия

Для выявления особенностей экспрессии генов был проведен транскриптомный анализ в ряде парных образцов: эктопический (Ec) и эутопический (Eu) эндометрий, полученных от пациенток с эндометриозом в пролиферативную фазу менструального цикла при низком и нормальном ОР. Образцы РНК, использованные для оценки экспрессии генов, включали также образцы РНК, полученные для секвенирования мкРНК. В результате анализа были получены списки дифференциально экспрессированных мРНК, распределение которых по образцам представлено на Рисунке 25. При сравнении эктопического и эутопического эндометрия при нормальном ОР (Рисунок 25, N Ec/Eu) была показана дифференциальная экспрессия 2491 гена, из которых 1363 гена с пониженной и 1128 генов с повышенной экспрессией в тканях ЭКЯ относительно тканей эутопического эндометрия. При сравнении экспрессии генов в тканях эктопического эндометрия относительно эутопического при низком ОР различия в экспрессии были значительно менее выражены: всего было выявлено 100 генов, из которых 53 с пониженной и 47 с повышенной экспрессией в тканях ЭКЯ относительно эутопического эндометрия (Рисунок 25, L Ec/Eu).

В образцах тканей ЭКЯ группы низкого ОР было выявлено 1358 дэ-мРНК: 699 с повышенной и 659 с пониженной экспрессией по сравнению с группой нормального ОР (Рисунок 25, Ec L/N). Различия экспрессии генов в тканях эутопического эндометрия между группами низкого и нормального ОР оказались менее выраженными, всего было выявлено 56 дифференциально экспрессируемых генов, из которых 35 с пониженной и 21 ген с повышенной экспрессией (Рисунок 25, Eu L/N). Таким образом, как и в случае с мкРНК, наблюдается выраженное снижение количества дифференциально экспрессированных генов в эктопическом эндометрии относительно эутопического при низком ОР.

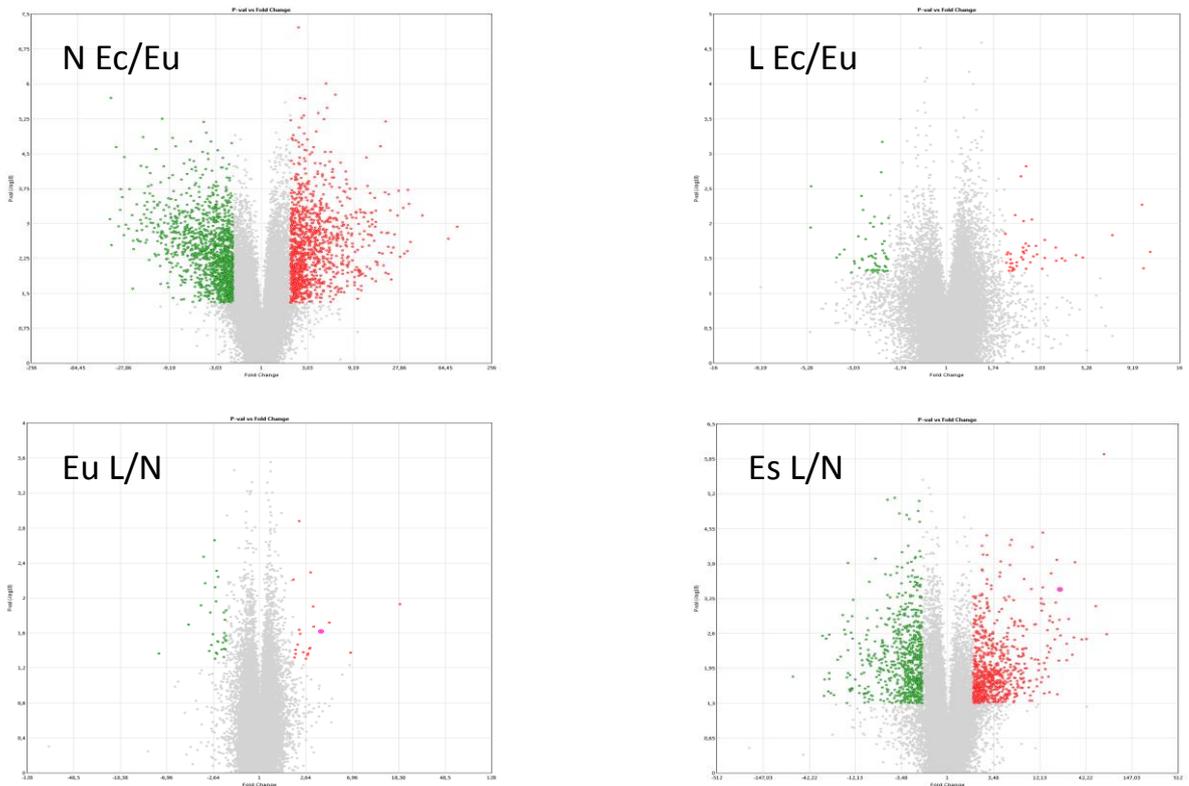
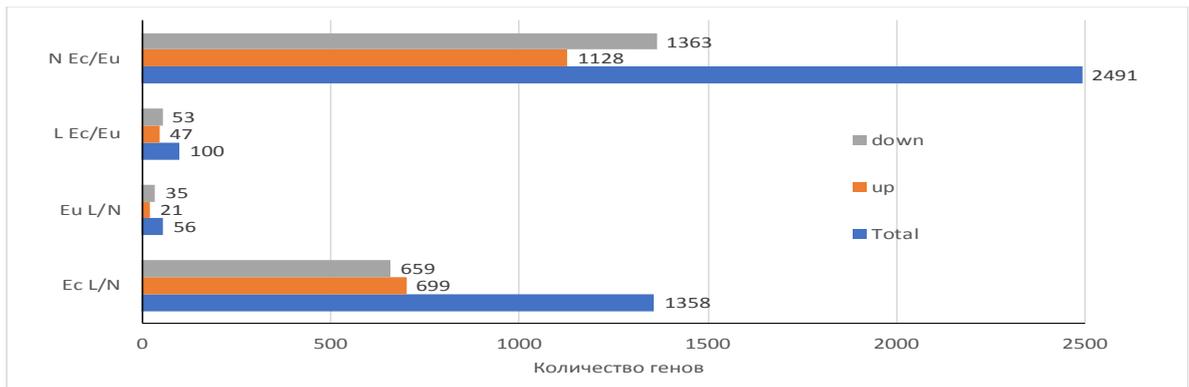


Рисунок 25 - Транскриптомный анализ экспрессии генов в тканях эндометрия. N – нормальный резерв; L – низкий резерв; Ec – эктопический эндометрий; Eu – эндотопический эндометрий.

Для определения возможного участия наборов генов во внутриклеточных каскадах был проведен биоинформационный анализ с использованием обогащения путей и процессов по базе данных Wikipathways. Для селекции путей и взаимодействий был использован ряд параметров: количество идентифицированных генов в сигнальном пути, XD-фактор и p-value. XD-фактор – параметр, оценивающий насколько выражено участие списка генов в том или ином пути, находящемся в сети молекулярных взаимодействий. Положительные и более высокие значения XD-фактора свидетельствуют о более вероятной ассоциации

найденных путей с выбранной группой генов. Параметр p-value оценивает вероятность ошибки в расчете XD-фактора.

Для дифференциально экспрессированных генов, идентифицированных при сравнении эктопического эндометрия и эутопического эндометрия, было отобрано 208 путей на основании значений p-value менее 0,05. Далее на основании значений XD-фактора и количества генов в сигнальном пути (n более 5) из полученного списка было отобрано 72 пути (Таблица 20).

Таблица 20 - Клеточные сигнальные пути и процессы регулируемые дифференциально экспрессируемыми генами

Пути и процессы	Общее кол-во генов	↑ кол-во генов	↓ кол-во генов	XD-фактор	p-value	Пути и процессы	Общее кол-во генов	↑ кол-во генов	↓ кол-во генов	XD-фактор	p-value
<b>Рак</b>						<b>Клеточная адгезия</b>					
Retinoblastoma Gene in Cancer	38	0	38	19.1	1.0E-07	Focal Adhesion	27	15	12	2.6	2.5E-03
Epithelial to mesenchymal transition in cancer	30	13	17	5.6	3.0E-06	Integrin-mediated Cell Adhesion	16	8	8	2.4	3.7E-03
Breast cancer pathway	24	8	16	3.3	5.7E-04	Cell surface interactions at the vascular wall	6	4	2	4.1	7.4E-05
Signaling Pathways in Glioblastoma	13	3	10	2.0	1.1E-02	Matrix Metalloproteinases	6	2	4	1.6	2.5E-02
Gastric Cancer Network 1	12	1	11	6.3	1.0E-07	<b>Развитие и дифференцировка</b>					
Pathways in clear cell renal cell carcinoma	12	5	7	1.4	3.8E-02	Ectoderm Differentiation	26	18	8	4.7	1.8E-05
Pancreatic adenocarcinoma pathway	12	5	7	1.4	4.1E-02	Adipogenesis	23	19	4	3.9	1.4E-04
Gastric Cancer Network 2	10	0	10	4.1	7.5E-05	Mesodermal Commitment Pathway	20	7	13	1.9	1.4E-02
Metabolic reprogramming in colon cancer	7	1	6	1.5	3.5E-02	Endoderm Differentiation	19	6	13	1.8	1.6E-02
Imatinib and Chronic Myeloid Leukemia	7	6	1	3.2	5.9E-04	ESC Pluripotency Pathways	18	9	9	2.4	3.7E-03
<b>Клеточный цикл</b>						Hair Follicle Development: Cytodifferentiation	17	6	11	3.4	3.8E-04
Cell Cycle	29	1	28	7.8	1.0E-07	Hair Follicle Development: Induction	13	6	7	4.0	1.1E-04
G1 to S cell cycle control	17	1	16	5.4	4.0E-06	Hair Follicle Development: Organogenesis	7	1	6	1.9	1.2E-02
DNA Replication	15	0	15	6.8	1.0E-07	Heart Development	10	6	4	2.7	2.2E-03
Cell Cycle Checkpoints	8	0	8	3.9	1.2E-04	Differentiation Pathway	10	6	4	2.6	2.5E-03
<b>ДНК</b>						Cardiac Progenitor Differentiation	10	6	4	2.3	5.4E-03
DNA IR-damage and cellular response via ATR	24	1	23	7.5	1.0E-07	White fat cell differentiation	8	5	3	2.7	2.0E-03
miRNA Regulation of DNA Damage Response	18	3	15	3.5	3.2E-04	Transcriptional cascade шт adipogenesis	6	4	2	3.7	1.9E-04
DNA Damage Response	17	3	14	5.1	8.0E-06	<b>Киназные каскады</b>					
Histone Modifications	14	0	14	3.4	3.7E-04	PI3K-Akt Signaling Pathway	59	33	26	8.9	1.0E-07
Genotoxicity pathway	12	4	8	2.6	2.5E-03	Focal Adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling	58	36	22	10.6	1.0E-07
DNA IR-DSBs and cellular response via ATM	10	0	10	2.0	1.0E-02	MAPK Signaling Pathway	31	19	12	2.3	4.6E-03
ATM Signaling Pathway	8	1	7	2.0	1.0E-02	Ras Signaling	24	18	6	2.2	7.1E-03
<b>Рецепторные каскады</b>						<b>Иммунomodулирование</b>					
Nuclear Receptors Meta-Pathway	40	24	16	2.7	1.8E-03	Complement and Coagulation Cascades	17	16	1	5.9	1.0E-06
VEGFA-VEGFR2 Signaling Pathway	28	22	6	1.5	3.5E-02	Complement and Coagulation Cascades	17	16	1	5.8	2.0E-06
Vitamin D Receptor Pathway	26	16	10	2.7	1.9E-03	Allograft Rejection	17	14	3	3.4	4.3E-04
G Protein Signaling Pathways	17	14	3	3.4	4.3E-04	Complement Activation	9	9	0	4.2	7.0E-05
LncRNA in canonical Wnt signaling	16	6	10	2.5	2.9E-03	Inflammatory Response Pathway	8	7	1	2.6	2.5E-03
Wnt Signaling Pathway	15	6	9	1.5	3.3E-02	Complement cascade	7	7	0	2.2	5.9E-03
Glucocorticoid Receptor Pathway	14	10	4	3.2	6.9E-04	IL1 and megakaryocytes in obesity	6	5	1	2.1	7.3E-03
ncRNAs in Wnt signaling	14	6	8	2.2	5.8E-03	<b>Фиброз</b>					
Wnt Signaling Pathway and Pluripotency	14	3	11	1.7	2.2E-02	Lung fibrosis	13	9	4	3.1	7.9E-04
Human TSH signaling pathway	10	2	8	1.5	3.0E-02	Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis	12	5	7	1.7	1.9E-02
PPAR signaling pathway	10	7	3	1.5	3.4E-02	Protein alkylation leading to liver fibrosis	10	8	2	1.4	4.3E-02
TGF-beta Receptor Signaling	9	6	3	1.7	2.0E-02	<b>Другие</b>					
Hedgehog Signaling Pathway	8	3	5	1.9	1.2E-02	Prostaglandin Synthesis and Regulation	11	8	3	3.3	4.6E-04
Nuclear Receptors	7	4	3	1.7	2.1E-02	Ovarian Infertility Genes	8	5	3	2.7	2.0E-03
Serotonin HTR1 Group and FOS Pathway	6	2	4	1.5	3.4E-02	Oxidative Damage	8	6	2	2.1	8.6E-03
						Oxidative Stress	6	4	2	1.7	1.9E-02
						Extracellular vesicles in the crosstalk	6	3	3	2.2	5.8E-03

↑,↓ - направление экспрессии генов; XD-фактор оценивает выраженность участия списка генов в пути; p-value - вероятность ошибки в расчете XD-фактора.

В таблице указано общее количество генов в пути и количество генов в пути с повышенной ( $\uparrow$ ) и пониженной ( $\downarrow$ ) экспрессией. Отбор по указанным параметрам выявил биологические пути, ассоциированные с опухолевыми процессами, иммунными реакциями, регуляцией клеточного цикла, дифференцировки, окислительного стресса. Также установлены внутриклеточные каскады, запускаемые рецепторами факторов роста, ядерными рецепторами и реализующиеся при участии MAPK, PI3K-Akt, mTOR, Wnt сигнальных путей.

На основании полученных списков генов было отобрано сорок семь путей, в состав которых входили гены-мишени дэ-мкРНК, выявленные на предыдущем этапе. Гены, их белковые продукты, их функции, а также мкРНК, для которых они являются мишенями, представлены в Таблице 21. Также указано количество сигнальных путей, частью которых является тот или иной ген. Из представленных генов с повышенной экспрессией можно отметить АКТ3, кодирующий протеинкиназу В, которая встречается в 11 сигнальных путях, стимулирующих пролиферацию. Среди генов с пониженной экспрессией можно отметить TP53, входящий в состав 15 путей, продуктом которого является белок p53, индуцирующий остановку клеточного цикла, апоптоз, и являющийся онкосупрессором. В целом, среди белковых продуктов генов-мишеней можно выделить транскрипционные факторы, регуляторы клеточного цикла, онкогены, факторы клеточной адгезии (Таблица 21). Данный набор эффекторов способен обеспечить многоуровневую регуляцию клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки. На основании полученных данных можно заключить, что изменение экспрессии мкРНК может служить дополнительным фактором, участвующим в развитии патологических процессов при эндометриозе.

Таблица 21 - Гены-мишени дэ-мкРНК, выявленные в результате транскриптомного анализа

Повышенная экспрессия					Пониженная экспрессия				
Ген	Белок	Функция	Пути	мкРНК	Ген	Белок	Функция	Пути	мкРНК
AKT3	AKT serine/threonine kinase 3	пролиферация, дифференцировка, апоптоз	11	hsa-miR-29a-3p, -29b-3p, -29c-3p, -16-5p	TP53	tumor protein p53	адаптация к стрессу, остановка клеточного цикла, апоптоз	15	hsa-miR-10b-5p, -34a-5p, 151a-5p, -16-5p, -214-3p, -25-3p, -28-3p, 30a-5p, 30b-5p, -30e-5p, -34a-5p
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 21	хемокин для моноцитов и базофилов	8	hsa-miR-1-3p, -542-3p	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	транскрипционный активатор, регулятор митоза, пролиферация	11	hsa-miR-34a-5p
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	рецептор, протоонкоген, пролиферация	8	hsa-miR-34a-5p	CDC25A	cell division cycle 25A	фосфатаза, регулятор G1/S перехода, онкоген	7	hsa-miR-34a-5p, -424-5p, -let-7c-5p
FZD7	frizzled class receptor 7	рецептор Wnt-пути, активатор пролиферации	7	hsa-miR-1-3p, -145-5p, -542-3p	CCNE2	cyclin E2	регулятор митотического цикла, G1/S переход	6	hsa-miR-26a-5p, -30a-5p, -30b-5p, -34a-5p
GATA4	GATA binding protein 4	транскрипционный фактор, дифференцировка	5	hsa-miR-1-3p	MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	выживание, миграция клеток	5	hsa-miR-1-3p, -101-3p, -34a-5p,
ITGA11	integrin alpha 11	клеточная адгезия	4	hsa-miR-29a-3p	ESR1	estrogen receptor 1	ядерный рецептор, транскрипционный фактор	4	hsa-miR-130a-3p, -29b-3p, -145-5p, -26a-5p, -29b-3p
ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	выделение кальция из ЭПС	4	hsa-miR-204-5p, -424-5p	ITGA6	integrin alpha 6	адгезия к внеклеточному матриксу, туморогенез	4	hsa-miR-29a-3p, -29b-3p, -29c-3p
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	активатор MAPK-пути, дифференцировка	3	hsa-miR-204-5p	LAMC2	laminin, gamma 2	адгезия эпителиальных клеток	4	hsa-miR-29a-3p, -29b-3p, -29c-3p
SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	растворимый рецептор Wnt-лигандов	3	hsa-miR-29a-3p	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	активатор Erk/MAP киназного каскада, дифференцировка	4	hsa-miR-29a-3p
FOXC1	forkhead box C1	транскрипционный фактор, эмбриональное развитие	2	hsa-miR-204-5p	CDH1	cadherin 1, type 1	клеточная адгезия, инвазия	3	hsa-miR-204-5p, -30a-5p, -92a-3p
GAS1	growth arrest-specific 1	окоусупрессор, блокирует переход в S-фазу	2	hsa-miR-34a-5p	FOXM1	forkhead box M1	транскрипционный активатор, регулятор митоза, пролиферация	2	hsa-miR-204-5p, -509-3-5p
NAV3	neuron navigator 3	рост аксонов	2	hsa-miR-29a-3p	MYB	MYB proto-oncogene, transcription factor	транскрипционный фактор, онкоген	2	hsa-miR-34a-5p, -424-5p, -16-5p
PIM1	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	выживание, пролиферация, гематопоз	2	hsa-miR-1-3p, -16-5p, -214-3p, -542-3p	PLK1	polo-like kinase 1	митотическая киназа, пролиферация	2	hsa-miR-100-5p, -509-3-5p
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	вазопрессор	1	hsa-miR-34a-5p	PODXL	podocalyxin-like	клеточная адгезия, дифференцировка	2	hsa-miR-145-5p, -509-3-5p
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	окоусупрессор, остановка роста эпителиальных клеток	1	hsa-miR-1-3p	BIRC5	baculoviral IAP repeat containing 5	ингибитор апоптоза	1	hsa-miR-214-3p, -34a-5p, -542-3p, -708-5p
					DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	метилование ДНК	1	hsa-miR-29a-3p, -29b-3p, -29c-3p, -30a-5p, 30b-5p

#### **Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

ЭКЯ одна из самых часто встречающихся форм эндометриоза [8]. Важными симптомами при эндометриозе являются боль и бесплодие [25; 29; 35; 127; 128]. Однако, при ЭКЯ болевой синдром может быть не выражен [21; 25; 34; 35]. Часто пациентка узнает о наличии ЭКЯ по данным УЗИ исследования, либо обращаясь к врачу по поводу бесплодия [37; 38; 39]. С момента образования ЭКЯ до момента ее обнаружения может пройти в среднем 7 – 8 лет [9; 25; 94; 127]. За время своего существования ЭКЯ может нанести значительный урон ОР за счет своего токсического влияния на окружающую ткань яичника, фолликулы [27; 69; 70; 71]. Хирургическое лечение ЭКЯ является частью глобального подхода к патологии эндометриоза. Лапароскопическая цистэктомия, в настоящее время «золотым стандартом» в лечении ЭКЯ [127; 127]. Во время операции по поводу ЭКЯ необходимо придерживаться тактики полной энуклеации стенки кисты после ее опорожнения [128]. Учитывая, что бесплодие является основной проблемой пациенток с ЭКЯ как до, так и после операции, очень важно учитывать репродуктивную функцию женщины, ее ОР до оперативного лечения. Во время операции хирург должен соблюдать баланс между полным удалением кисты с целью избежания рецидива и сохранением овариального резерва пациентки. В последние годы было опубликовано все больше статей, подтверждающих непреднамеренное и нежелательное повреждение яичникового резерва после лапароскопического удаления ЭКЯ [121; 122; 123; 125; 126; 135; 142]. В тоже время, есть мнение, что ОР восстанавливается через 6 – 12 месяцев после хирургического вмешательства, нет четких сроков наблюдения и оценки ОР в послеоперационном периоде [154; 184]. Нет единого мнения по поводу тактики ведения пациенток с ЭКЯ и бесплодием, нуждающихся в ЭКО. Одними учеными показано улучшение результатов ЭКО, увеличение частоты наступления спонтанной беременности после лапароскопической энуклеации ЭКЯ [160; 161; 164]. Другие исследователи утверждают, что нет положительного влияния оперативного вмешательства на репродуктивные исходы, а наоборот, происходит снижение ОВР после операции [151; 153; 155; 158].

Учитывая выше описанные контраргументы в тактике ведения пациенток с ЭКЯ, мы провели проспективное исследование, в котором оценивали состояние ОР женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ до оперативного лечения, а также в послеоперационном периоде (через 3 и 6 месяцев). В нашей работе мы стремились выявить наиболее важные факторы в прогнозировании снижения ОР после лапароскопической энуклеации ЭКЯ.

В исследование были включены 136 женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ. Учитывая тот факт, что ЭКЯ вызывают повреждение фолликулярного аппарата яичника [42; 43; 49; 56; 67; 69; 70; 71 72; 73; 74], всем пациенткам на этапе до хирургического лечения была проведена оценка состояния овариального резерва. ОР состоит из двух элементов: количества первичных фолликулов и качества ооцитов [44; 45]. ОР уменьшается с увеличением возраста, что приводит к снижению репродуктивной функции [46; 50; 52; 53]. АМГ – димерный гликопротеиновый гормон, относящийся к семейству трансформирующего фактора роста  $\beta$ . АМГ вырабатывается в клетках гранулезы из преантральных и ранних антральных фолликулов, не зависит от менструального цикла и используется в качестве маркера ОР [100; 102]. При оценке ОР до операции (на основании Болонских критериев) нами было установлено, что из 136 пациенток с ЭКЯ 87 женщин (64%) имели нормальный ОР, они составили I группу исследуемых. 49 пациенток (36%) с ЭКЯ имели низкий ОР до операции и составили II группу исследуемых. В возрасте старше 30 лет находилось 73,5% пациенток II группы и 43,7% пациенток I группы,  $p < 0,05$ . Показатели ОР до хирургического лечения (уровень АМГ, количество антральных фолликулов по данным УЗИ, а также уровень ФСГ), достоверно отличались в обеих группах,  $p < 0,001$ . Следует отметить, что уровень АМГ в среднем в I группе составил  $4,02 \pm 2,24$  нг/мл, во II  $0,78 \pm 0,32$  нг/мл. Уровень ФСГ при этом, был  $5,36 \pm 2,41$  МЕ/л в I группе и  $9,15 \pm 3,06$  МЕ/л во II группе. Уровень ФСГ выше пороговых значений нормы (10 МЕ/л) во II группе пациенток был зафиксирован лишь в 38,8% случаев (21 пациентка). Полученные данные о среднем уровне гормонов (АМГ и ФСГ) указывают на то, что не во всех случаях оценка уровня только одного ФСГ может свидетельствовать

о снижении овариального резерва, что подтверждается рядом других исследований [126; 100; 101]. Также количество антральных фолликулов по данным УЗИ до операции во II группе пациенток была снижена лишь в 57,1% случаев. Этот факт можно объяснить наличием технических трудностей подсчета антральных фолликулов в яичнике с эндометриоидной кистой. Так в работе M.L. Lima подтверждается, что наличие эндометриоидной кисты в яичнике снижает способность идентифицировать антральные фолликулы с помощью трансвагинального УЗИ [185]. Таким образом, оценка уровня АМГ в комплексе с другими показателями, является более четким критерием состояния овариального резерва, что подтверждается отечественными и зарубежными исследованиями [44; 185; 186; 187; 188]. При анализе жалоб, с которыми пациентки обратились за медицинской помощью преобладал болевой синдром (63,2% в I группе и 81,6% во II группе) и бесплодие (35,6% в I группе и 44,9% во II группе). Во II группе пациентки чаще предъявляли жалобы на боли в нижних отделах живота, по сравнению с I группой,  $p < 0,05$ . Жалобы на бесплодие встречались в обеих группах с одинаковой частотой. Наши данные подтверждают одно из положений Глобального Консенсуса (2013 год), что вопросы о наличии болевого синдрома и безуспешных попыток забеременеть в анамнезе, должны стать рутинными в практике каждого врача [128]. При анализе жалоб характерным было длительное существование болевого синдрома. В I группе боли внизу живота с локализацией в правую или левую подвздошную область существовали в среднем  $18,49 \pm 14,05$  месяцев, во II группе подобные боли присутствовали в среднем  $31,66 \pm 26,70$  месяцев. Длительность болевого синдрома статистически достоверно выше во II группе пациенток,  $p < 0,05$ . Несмотря на длительность болевого синдрома, ЭКЯ были обнаружены в среднем через 6 месяцев после появления выше описанных жалоб в I группе и через 18 месяцев во II группе женщин. Полученная статистически достоверная взаимосвязь длительности существования ЭКЯ и низкого ОР, может свидетельствовать о том, что задержки в диагностике ЭКЯ и длительное существование эндометриоза яичников во II группе пациенток послужило негативным фактором по отношению к ОР и могло привести к его

снижению. Наши данные соответствуют выводам общемирового исследования под эгидой Международного общества по эндометриозу о том, что диагностика эндометриоза происходит с большим временным промежутком от момента появления первых симптомов [189].

При оценке репродуктивной функции пациенток с ЭКЯ, отмечалась низкая частота беременности в анамнезе у женщин обеих групп. В I группе частота беременности составила 31% во II группе - 22,4%. Как уже было сказано выше, одной из основных проблем женщин, включенных в наше исследование, было бесплодие. Характерно то, что длительность бесплодия в I группе составила в среднем  $2,97 \pm 2,47$  лет, во II группе – в среднем  $5,18 \pm 3,11$  лет. Статистически достоверно более длительное время бесплодием страдали пациентки II группы по сравнению с I группой,  $p < 0,05$ . Продолжительность бесплодия более 5 лет встречалась достоверно чаще во II группе,  $p < 0,05$ . Таким образом, оценка ОР у женщин с ЭКЯ и бесплодием в анамнезе является важным моментом перед оперативным вмешательством.

Обращает на себя внимание и тот факт, что во II группе продолжительность менструального цикла в среднем была  $26,67 \pm 2,3$  дней, а в I группе -  $28,66 \pm 2,99$  дней,  $p < 0,001$ . В работах Т.А. Назаренко [96] установлено, что укорочение менструального цикла до 23 – 25 дней является неблагоприятным признаком и может указывать на снижение ОР. В нашем исследовании длительность менструального цикла во II группе менее 26 дней была в 47% случаев, тогда как в I группе менструальный цикл длился более 26 дней в 81,6% случаев ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, длительное существование болевого синдрома до момента обнаружения ЭКЯ, длительное бесплодие в анамнезе, укорочение менструального цикла в сочетании с более старшим возрастом должны явиться предостерегающими факторами возможного снижения ОР у пациенток с ЭКЯ. При выявлении данных факторов необходимо тщательное обследование состояния ОР перед оперативным лечением у данных пациенток с целью сохранения репродуктивной функции.

Рецидивирование ЭКЯ является одной из основных проблем данной патологии наряду с бесплодием. Многие исследования проанализировали частоту рецидивов ЭКЯ после лапароскопической операции и обнаружили, что частота рецидивов составляет от 11,0% до 30,4% после 2 лет наблюдения и более [127; 166; 190]. При этом, повторные операции на яичниках по поводу ЭКЯ могут привести к снижению уровня АМГ до 40% в послеоперационном периоде, что приводит к повреждению и без того истощенной ткани яичника, уменьшает ОР и нарушает репродуктивную функцию [164; 165; 166]. Частота наступления беременности после повторной операции по поводу ЭКЯ вдвое меньше по сравнению с первой операцией [125; 132; 160]. В нашем исследовании рецидив ЭКЯ отмечен в 30,6% случаев в группе низкого ОР, по сравнению с 6,9% случаев в группе нормального ОР,  $p < 0,001$ . В таком же проценте случаев было произведено оперативное вмешательство на яичниках по поводу ЭКЯ в анамнезе у пациенток обеих групп. Также операции на яичниках в анамнезе производились по поводу ДОЯ и апоплексии яичников. В общей сложности оперативное вмешательство на яичниках в анамнезе перенесли 9 пациенток (10,3%) из I группы и 19 пациенток (38,8%) из II группы,  $p < 0,001$ , что статистически достоверно явилось риском снижения ОР в послеоперационном периоде. Повторная операция на яичниках по поводу рецидивирующих ЭКЯ может дать нежелательный эффект и привести к значительному снижению ОР [160]. Следовательно, низкий ОР до операции в сочетании с рецидивирующим эндометриозом, оперативными вмешательствами на яичниках в анамнезе и бесплодием у женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ должен быть предиктором выбора индивидуальной тактики лечения данных пациенток и определения показаний для оперативного лечения.

Интраоперационно нами выявлено в 42,9% случаев наличие двусторонних ЭКЯ во II группе пациенток, по сравнению с 23% в I группе,  $p < 0,05$ . Двустороннее поражение яичников эндометриоидными кистами достоверно снижает ОР до операции. Общий размер опухоли составил  $7,87 \pm 4,70$  см во II группе по сравнению с  $6,01 \pm 4,17$  см в I группе пациенток,  $p < 0,05$ . ЭКЯ диаметром более 4 см. были выявлены в 50,6% в I группе и в 75,5% во II группе,  $p < 0,05$ . При этом, во II группе

в 40,8 % случаев были представлены двусторонними кистами диаметром более 4 см по сравнению с 6,9% в I группе. Наши наблюдения позволяют сделать вывод, что длительное существование двусторонних ЭКЯ, больших размеров может привести к снижению овариального резерва до операции.

Результаты нашего исследования показали, что возраст женщин старше 30 лет, наличие в анамнезе операций на яичниках, 3 – 4 стадия распространения процесса, были связаны с низким овариальным резервом у пациенток с эндометриоидными кистами до хирургического лечения ( $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствуют о том, что еще до операции у женщин с эндометриоидными кистами может быть снижен овариальный резерв. Тщательный сбор анамнеза, выявление факторов риска, измерение уровня гормонов в сыворотке крови (АМГ и ФСГ), оценка ультразвуковых критериев сниженного овариального резерва у пациенток с эндометриоидными кистами в предоперационном периоде позволит выделить группу риска низкого овариального резерва после операции и выработать индивидуальный подход к тактике ведения данных пациенток.

В послеоперационном периоде нами проводилась оценка овариального резерва (через 3 месяца и через 6 месяцев наблюдения) и выявление факторов риска его снижения у всех 136 женщин. Снижение уровня АМГ в послеоперационном периоде происходило у 100% пациентов. Уже через 3 месяца после операции уровень АМГ снижался в 2 раза, как в I, так и во II группе. Уровень ФСГ при этом возрастал в два раза. Ультразвуковые критерии также свидетельствовали о снижении овариального резерва: количество антральных фолликулов менее 5 было в 26,4% случаев в I группе и в 83,7% случаев во II группе через 3 месяца после операции, через 6 месяцев послеоперационного периода уже в 28,7% случаев и в 83,7% случаев в I и II группах соответственно. Снижение овариального резерва продолжалось в течении всех 6 месяцев наблюдения после операции.

Комплексный анализ овариального резерва в послеоперационном периоде показал, что в I группе женщин через 3 месяца 19,5% имели низкий овариальный резерв, а через 6 месяцев овариальный резерв был низким у 20,7% пациенток. Нами было установлено, что уровень АМГ в сыворотке крови до операции, двусторонняя

резекция яичников, диаметр удаляемых кист более 4см являются наиболее значимыми факторами, приводящими к развитию низкого овариального резерва через 3 и 6 месяцев после операции. Наше исследование согласуется с рядом ранее проведенных работ, которые подтверждают, что двусторонняя резекция и предоперационный уровень АМГ являются решающими факторами снижения овариального резерва в послеоперационном периоде [29; 30; 31; 32; 33]. Ряд исследователей полагают, что постепенное снижение АМГ в послеоперационном периоде происходит вследствие послеоперационной травмы тканей яичников, сосудистого спазма, потери фолликулов. Данные процессы более выражены при двусторонней цистэктомии, тогда как при односторонней цистэктомии, могут нивелироваться за счет здорового яичника [34; 35]. Хотя, до настоящего времени точные механизмы снижения овариального резерва до и после операции у женщин с эндометриоидными кистами яичников до конца не выяснены. Мы считаем, что послеоперационный овариальный резерв зависит от предоперационного потенциала яичников. Зная овариальный резерв каждой конкретной пациентки, врач сможет выработать индивидуальный подход и сохранить репродуктивную функцию женщин. Изучение АМГ совместно с ФСГ, объемом яичников и количеством антральных фолликулов до операции остается актуальным для сохранения овариального резерва в послеоперационном периоде у женщин с эндометриоидными кистами [36; 37]. Также, не менее значимым для сохранения овариального резерва является тщательное удаление капсулы эндометриоидной кисты с одновременным бережным отношением к тканям яичника и сохранением всего пула фолликулов [38].

Нами было отмечено, что спонтанная беременность наступила только в группе женщин с нормальным овариальным резервом до операции (в 26,3% случаев), имевших средний уровень АМГ до операции  $5,05 \pm 2,16$  нг/мл и  $3,35 \pm 1,59$  нг/мл через 6 месяцев после операции.

В связи с этим, остается актуальным вопрос использования ВРТ у пациенток, перенесших хирургическое вмешательство по поводу эндометриоидной кисты яичника и планирующих в дальнейшем беременность. В литературе обсуждается

возможность проведения ЭКО пациенткам с эндометриоидными кистами яичников, которые ранее перенесли оперативное лечение по поводу эндометриоза и в настоящее время имеют сниженный овариальный резерв. При этом, есть данные, что ответ яичников у пациенток с эндометриоидными кистами на стимуляцию овуляции, а также результаты ЭКО значительно ниже, чем у здоровых женщин [40; 41].

Таким образом ЭКЯ в сочетании с низким ОР до операции, наличие рецидива ЭКЯ, бесплодия в анамнезе, двусторонних ЭКЯ, большие размеры кист и обширная степень распространения эндометриоза являются прямым показанием для использования методов сохранения репродуктивной функции до операции. На сегодняшний момент технологии сохранения фертильности известны и хорошо отработаны, включают такие методы, как заморозка ооцитов и эмбрионов, а также криоконсервирование яичниковой ткани. Использование технологий сохранения фертильности позволит выполнить адекватный объем оперативного лечения при ЭКЯ, направленный на снижение риска рецидивирования и при этом сохранить репродуктивную функцию у пациенток с высоким риском снижения ОР и бесплодия в послеоперационном периоде [191; 192].

Актуальным является проблема поиска неинвазивных маркеров эндометриоза на ранней стадии его развития. В настоящее время накапливаются данные исследований по оценке экспрессии мкРНК в эутопическом и эктопическом эндометрии. Для выявления изменений в уровнях мкРНК используют подходы, связанные с определением как определенного набора мкРНК [193; 194; 195; 196; 197; 198], так и методы высокопроизводительного профилирования [199; 200; 201; 202; 203; 204; 205]. Использование высокопроизводительных технологий (секвенирование нового поколения или микрочиповые технологии) позволяет получать широкий спектр дифференциально экспрессирующихся мкРНК, в связи с чем данный подход представляется наиболее перспективным. Стоит отметить, что в исследованиях, в которых проводились такие анализы [199; 200; 201; 202; 203; 204; 205], наблюдалось относительно вариабельное число дифференциально экспрессированных мкРНК в тканях

эндометрия (от 5 до 156 мкРНК в исследовании). Причинами таких расхождений может быть как гетерогенность тканей эктопического и эутопического эндометрия, а также локализация исследуемых эндометриоидных гетеротопий. Кроме этого, в большинстве работ экспрессия изучалась только в одной фазе цикла. Так в трех из этих работ исследовались ЭКЯ [201; 202; 205], в двух локализация гетеротопий не уточнялась [203; 204] и в одной работе изучали перитонеальные поражения [200]. Сравнительный анализ всех полученных данных без учета локализации очагов показал небольшое перекрытие между результатами этих шести исследований. Четырнадцать мкРНК были дифференцированно экспрессированы, по крайней мере, в трех исследованиях и только мкРНК-200b была представлена во всех шести исследованиях. Также следует отметить, что ни в одном из вышеупомянутых исследований не сообщалось о применении множественной коррекции тестирования при анализе данных, и поэтому некоторые из сообщенных ассоциаций также могут быть ложноположительными.

В нашем исследовании были получены списки мкРНК, демонстрирующих дифференциальную экспрессию в эндометриоидных кистах яичника в первую фазу цикла, при разных типах овариального резерва. Сравнение приведенного выше списка мкРНК из данных других авторов со списками, полученными в нашем исследовании, показало присутствие 12 пересекающихся мкРНК, у которых также наблюдалось совпадение по направлению изменений экспрессии.

Наиболее часто встречающимися во всех исследованиях дэ-мкРНК являются представители семейства miR-200. В данной работе дифференциальная экспрессия представителя данного семейства hsa-miR-200a-5p была показана только в паре сравнения Ec/Eu при нормальном резерве. Было зафиксировано снижение экспрессии данной мкРНК в тканях эктопического эндометрия.

В результате проведенного исследования было установлено существенное изменение экспрессии мкРНК в эктопическом и в эутопическом эндометрии при нормальном ОВР (100 дэ-мкРНК). Важно отметить, что при низком ОВР отличия в экспрессии мкРНК между Ec и Eu были менее выражены (15 дэ-мкРНК). Можно предположить, что в основе наблюдаемых изменений экспрессии мкРНК при

низком и нормальном ОВР существенную роль играет изменение гормонального контроля функций эндометрия со стороны патологически измененных яичников. В пользу этого также свидетельствуют выявленные отличия в экспрессии мкРНК в парах сравнения одной локализации (EcL-EcN, EuL-EuN) при низком и нормальном резерве. Изменение состава и направления экспрессии ряда мкРНК может оказывать влияние на экспрессию их генов-мишеней в эктопическом эндометрии, что в свою очередь может как стимулировать прогрессирование эндометриоза, так и оказывать дополнительное негативное действие на ОР за счет модулирования гормонзависимых сигнальных путей и сигнальных каскадов, сопряженных с воспалением. Влияние эстрогенов и прогестерона на экспрессию мкРНК было показано в ряде работ с использованием как культивируемых клеток эндометрия, так и клеток, полученных в пролиферативную и секреторную фазу цикла [206; 207]. Помимо локализации в пределах одной клетки, мкРНК потенциально могут действовать дистанционно, за счет секреции в составе экзосом. Было установлено, что экзосомы содержат, мкРНК, мРНК и белки, способные модулировать иммунные реакции, выживание и дифференцировку клеток [208]. Экзосомы эпителиальных и стромальных клеток эндометрия содержат мкРНК, мишенями которых являются молекулы клеточной адгезии, компоненты внутриклеточного каскада Jak-STAT и сигнальных путей VEGF и Toll-подобных рецепторов [209]. При этом экзосомы эндометрия могут участвовать как в процессе имплантации, обеспечивая коммуникацию между клетками стенки матки и эмбрионом, так и в формировании гетеротопий за счет влияния на активность резидентных клеток в месте развития очага [210]. В ряде работ было показано участие некоторых мкРНК в индукции апоптоза клеток гранулезы и замедлении созревания ооцитов [211; 212]. Можно предположить, что мкРНК секретируемые в составе экзосом клетками эктопического эндометрия могут влиять на овариальную функцию за счет изменения сигнальных каскадов в клетках яичника. Таким образом, дисбаланс в экспрессии мкРНК в тканях кисты при нормальном ОВР может способствовать прогрессированию патологического процесса, развитие которого усиливает токсическое действие на ткани яичника.

Постепенное снижение функции яичника в результате этого воздействия приводит к переключению клеточного гомеостаза на гормон-независимые регуляторные каскады (Wnt, Notch, Hedghog, Tgfb). Этому также может способствовать снижение экспрессии гормон-чувствительных регуляторных мкРНК как в эктопическом, так и в эутопическом эндометрии. Отсутствие регуляторных влияний приводит к нарушению процессов пролиферации, дифференцировки, воспаления в тканях эндометрия, что может способствовать токсическому действию на ткань яичника со стороны кисты, а также приводить к нарушению децидуализации и снижению рецептивности эутопического эндометрия. В совокупности, приведенные факторы могут вносить весомый вклад в развитие бесплодия у больных эндометриозом яичников. Как к про индуцируемые играть как компенсаторную роль за счет регуляции п, так и стимулировать.

Транскриптомный анализ мРНК также показал значительное снижение количества дифференциально экспрессируемых генов в эктопическом эндометрии относительно эутопического при низком ОВР, что свидетельствует о менее выраженных различиях на уровне транскрипции между эктопическим и эутопическим эндометрием при снижении функции яичников. На основе анализа количества дифференциально экспрессированных генов в эутопическом эндометрии при низком и нормальном резерве можно предположить, что снижение функции яичников в меньшей степени сказывается на формировании различий в экспрессии генов в тканях данной локализации. При этом сравнение экспрессии генов в эктопическом эндометрии при разных типах резерва показало наличие выраженных отличий между тканями овариальных кист. Таким образом, в зависимости от состояния овариального резерва могут наблюдаться существенные изменения в экспрессии мкРНК и мРНК, что необходимо учитывать при формировании групп сравнения в дальнейших исследованиях эндометриоза.

При помощи биоинформационного анализа было продемонстрировано, что изменение паттернов экспрессии мкРНК и мРНК в эутопическом и эктопическом эндометрии может приводить к дисбалансу внутриклеточных каскадов и способствовать развитию эндометриоза. Было установлено, что совпадающие

гены, идентифицированные в парах сравнения Es/Eu при низком и нормальном овариальном резерве, входят в состав 10 путей, задействованных в опухолевом процессе, и 4 путей, участвующих в регуляции клеточного цикла. Также обращает на себя внимание обогащение по путям, связанным с повреждением и репарацией ДНК (7 путей). Данное наблюдение свидетельствует о дестабилизации генетического аппарата в клетках эктопического эндометрия, что может быть связано с генотоксическим действием окислительного стресса. Гены, участвующие в клеточных ответах на повышение реактивных форм кислорода, также были выявлены в результате проведенного анализа (Таблица 21). Сходные результаты были получены при обогащении списков генов-мишеней дэ-мкРНК. Было выявлено несколько путей, обеспечивающих регуляцию адаптивного ответа клеток в условиях окислительного стресса. Одним из факторов развития окислительного стресса является процесс воспаления, наличие которого в очагах эндометриоза хорошо известно. Транскриптомный анализ выявил гены, участвующие в воспалительных реакциях, в клеточных ответах при стимуляции ИЛ-1, а также при активации системы комплимента (Таблица 21). На уровне мишеней мкРНК также были показаны пути, связанные с воспалительным ответом и внутриклеточными каскадами, реализуемыми при участии интерлейкинов (ИЛ-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-9), а также при активации системы комплимента. Недавно было показано разнонаправленное изменение содержания интерлейкинов ИЛ-2,-5,-7,-9 в тканях эктопического эндометрия относительно эутопического. В частности, наблюдалось повышение уровня ИЛ-2 и снижение содержания ИЛ-5, -7, -9, а также снижение количества антагониста рецептора интерлейкина 1 ИЛ-1ra в тканях эктопического эндометрия [213]. В другом исследовании наблюдалось повышение экспрессии рецептора ИЛ-1 типа I в эндометриоидных очагах, что может свидетельствовать в пользу дисрегуляции клеточных ответов, запускаемых ИЛ-1, в очаге воспаления [214]. Так, ИЛ-1 может индуцировать секрецию ИЛ-6 фибробластами, эндотелиальными клетками и циркулирующими моноцитами [215] и может стимулировать секрецию ИЛ-8 клетками эндометрия [216]. Активация путей ИЛ-6 и ИЛ-8 способствует развитию воспаления за счет стимуляции миграции и активации

лейкоцитов. Продукция IL-6 клетками эндометрия повышается в ответ на стимуляцию эстрогенами, уровень которых увеличивается в ответ на действие IL-1 and TNF-а [217]. IL-6 играет важную роль в процессах воспаления за счет активации Т-лимфоцитов и стимуляции дифференцировки В-клеток.

IL-1 также может стимулировать экспрессию COX-2, в результате чего повышается продукция PGE2. Повышение экспрессии рецептора IL-1 и снижение экспрессии его антагониста может приводить к гиперэкспрессии COX-2 в тканях эндометрия, что было подтверждено в ряде работ [218; 219]. Синтез и секреция PGE2 может дополнительно стимулировать экспрессию COX-2, кроме того, было показано, что PGE2 способен индуцировать продукцию ароматазы, которая является ключевым регуляторным ферментом в биосинтезе эстрогенов [220]. Таким образом, синтез PGE2 обеспечивает на локальном уровне поддержание повышенного содержания простаноидов и эстрогенов. Кроме этого, PGE2 также способен повышать фагоцитарную активность иммунных клеток и стимулировать ангиогенез через увеличение экспрессии VEGF [220], что дополнительно способствует выживанию клеток эндометриоидных гетеротопий. Указанные наблюдения согласуются с полученными нами данными об участии дифференциально экспрессированных генов и генов-мишеней мкРНК в путях биосинтеза простагландинов и сигнальных каскадах, запускаемых эстрогенами.

Продукция IL-5 наблюдается преимущественно в тучных клетках при развитии аллергического ответа поздней фазы [221] и может вносить существенный вклад в развитие воспаления в тканях эктопического эндометрия. Повышение содержания IL-7 может стимулировать продукцию MIP-1beta (воспалительный белок макрофагов), который является воспалительным хемокином. Повышенная экспрессия IL-7 была показана в воспаленных тканях при аутоиммунных заболеваниях [222]. Помимо IL-7, IL-2 и IL-10 также ассоциированы с аутоиммунными состояниями, что свидетельствует о наличии аутоиммунного компонента в комплексном иммуномодулирующем эффекте различных цитокинов. Имеются данные, указывающие на наличие изменений в активности В-клеток и увеличение количества аутоантител у женщин с эндометриозом. Среди них

различают антитела к фосфолипидам, гистонам, полинуклеотидам, а также антитела специфические к тканям эндометрия и яичников [223]. Таким образом, дисрегуляция иммунных ответов в тканях эктопического эндометрия может приводить к повышению активности макрофагов, усилению пролиферативного ответа со стороны лейкоцитов и клеток эндометрия и образованию аутоантител. Лейкоциты и другие клетки выделяют цитокины и факторы роста во внеклеточное пространство эндометрия, где они могут функционировать как паракринные медиаторы, влияющие на активность соседних тканей. Таким образом, воспалительный процесс и окислительный стресс могут вносить существенный вклад в совокупность патогенетических процессов, приводящих к нарушению функции яичников и снижению овариального резерва.

Установлено, что у больных эндометриозом в фолликулярной жидкости наблюдается повышение содержания IL-1beta, IL-6 и TNF-alfa и снижение уровня VEGF [124; 125]. Снижение уровня VEGF у женщин с эндометриозом может приводить к снижению качества эмбрионов и вероятности имплантации, в частности за счет нарушений ангиогенеза и трофики клеток яичника [126]. Повышение уровня цитокинов в свою очередь может вызывать нарушения клеточного цикла фолликулярных клеток и приводить к замедлению созревания ооцитов [127].

Также было показано, что повышение уровня IL-6 в преовуляторных фолликулах пациентов с эндометриозом приводит к снижению активности ароматазы через активацию сигнального пути MAPK. Снижение активности ароматазы приводит к снижению конверсии фолликулами андростендиона в эстрон и его преобразования в тестостерон, который превращается в эстроген. Снижение продукции эстрогенов фолликулами лежит в основе снижения овариального резерва и бесплодия [128; 129]. Снижение содержания прогестерона в фолликулярной жидкости было также показано у больных эндометриозом, что может быть подтверждением нарушений стероидогенеза в яичниках [226].

Продукция цитокинов и активация лейкоцитов на локальном уровне может приводить к усилению продукции реактивных форм кислорода и развитию

окислительного стресса. У больных эндометриозом было обнаружено повышение уровня маркеров окисления ДНК и перекисного окисления липидов в клетках гранулезы, что может быть причиной нарушения их функций и приводить к замедлению роста фолликулов [227]. Показано также, что окислительный стресс индуцирует повреждение геномной и митохондриальной ДНК, что непосредственно приводит к снижению фертильности [230]. В ряде исследований было установлено, что инкубация гамет и эмбрионов в присутствии перитонеальной жидкости больных эндометриозом приводит к повышению дефрагментации ДНК и что степень повреждения коррелирует с длительностью экспозиции и тяжестью [231]. Можно предположить, что увеличение повреждения ДНК ооцитов и эмбрионов приводит к увеличению числа выкидышей, к неудачам при оплодотворении и имплантации у пациентов с эндометриозом.

Далее в процессе биоинформационной обработки данных, было выявлено 15 путей, запускаемых активацией клеточных рецепторов. Наиболее представленными по количеству генов явились пути, ассоциированные с ядерными рецепторами, к которым, в частности, относятся рецепторы к половым гормонам. В частности, наблюдалось снижение экспрессии рецепторов к прогестерону, а также снижение экспрессии эстрогенового рецептора 1-го типа (ESR1) и повышение экспрессии эстрогенового рецептора 2-го типа (ESR2) в очагах эктопического эндометрия. С данным фактом связывают развитие резистентности к прогестерону и снижение его антипролиферативного эффекта. Изменение соотношения уровней экспрессии подтипов эстрогеновых рецепторов было показано ранее, причем повышение экспрессии ESR2 было ассоциировано со снижением метилирования промотора его гена [232]. Также было установлено, что повышение экспрессии ESR2 приводит к подавлению экспрессии ESR1, при этом усиление сигнализации через ESR2 приводило к снижению экспрессии рецепторов к прогестерону [232; 233]. Данный механизм способствует развитию резистентности к прогестерону и снижению его антипролиферативного и проапоптотического влияния на клетки эктопического эндометрия, а также к снижению экспрессии фермента метаболизма эстрогенов [234; 235].

Помимо путей ядерных рецепторов были выявлены пути, активируемые рецепторами факторов роста (VEGF, TGFbeta, Hedgehog, Notch) и некоторых гормонов (тиреотропин, глюкокортикоиды), которые реализуются через сигнальные каскады, ключевыми регуляторами которых являются киназы PI3K, Akt, Ras, MAPK. Также показано четыре пути, включающие Wnt сигнальный каскад, играющий важную роль в процессах пролиферации и клеточной дифференцировки, который запускается Wnt-лигандами и их рецепторами (Frizzled- рецепторы или FZD). Сигнальные пути Wnt, Hedgehog, Notch являются ключевыми в регуляции активности стволовых клеток для осуществления процессов развития, обновления и регенерации тканей млекопитающих, в том числе и эндометрия. В последнее время на основании результатов ряда исследований предполагается, что поддержание и развитие эндометриодных гетеротопий происходит не только в результате изменения продукции половых гормонов и экспрессии их рецепторов, но и за счет дисбаланса в сигнализации указанных выше путей [236]. Дискутируется также вопрос о том, что развитие и рецидив заболевания могут быть связаны с образованием стволовых клеток в тканях эндометрия, способных пережить длительное отсутствие эстрогеновой стимуляции на фоне медикаментозной терапии или при снижении функции яичников. Поддержание клона таких клеток и их последующая экспансия может регулироваться при участии Wnt, Hedgehog и Notch сигнальных каскадов [236; 237].

Кроме этого, выявлен сигнальный путь, запускаемый серотониновыми рецепторами. Модулирование серотониновой сигнализации может быть связано со снижением порога болевой чувствительности и развитии болевого синдрома у больных эндометриозом.

Отдельно стоит отметить обогащение по пути развития бесплодия, связанного с нарушением овариальной функции. В данный путь вошли 8 дифференциально экспрессированных генов: 5 с повышенной экспрессией и 3 с пониженной экспрессией. В частности, наблюдается снижение экспрессии генов прогестероновых и пролактиновых рецепторов и повышение экспрессии генов

эстрогенового рецептора второго типа, рецептора фолликулостимулирующего гормона и рецептора простагландина E2. Помимо рецепторов, были также выявлены гены, входящие в пути биосинтеза простагландинов. Можно предположить, что PGE2 и другие эйкозаноиды, образующихся в тканях ЭКЯ, помимо участия в воспалительных реакциях, могут оказывать действие на соседние ткани яичника, влияя на активацию и атрезию фолликулов. Необходимо подчеркнуть, что дисрегуляция экспрессии мкРНК в эутопическом эндометрии и нарушения клеточной сигнализации указанных выше путей также могут вносить существенный вклад в развитие бесплодия у больных эндометриозом, за счет нарушения процессов децидуализации. Формирование адекватного интерфейса на внутренней поверхности матки, обеспечивающего прикрепление, инвазию, трофику и иммунорезистентность зародыша, необходимо для успешной имплантации и развития беременности. Поэтому aberrantная децидуализация является одним из ключевых факторов формирования бесплодия. Идентифицировано несколько клеточных путей, способных при эндометриозе вызывать дефекты децидуализации. Основным гормоном, инициирующим и поддерживающим децидуализацию, является прогестерон. Было показано, что клеточные пути, реализуемые при участии протеинкиназы А (РКА) усиливают эффекты прогестерона, тогда как активация АКТ и MAPK киназных путей их ингибируют [238]. Активация АКТ - киназного пути может также приводить к снижению экспрессии рецепторов прогестерона, что было показано на примере стромальных клеток эндометрия полученных от больных эндометриозом [239; 240]. Кроме этого, ингибиторы АКТ - киназы повышают экспрессию прогестероновых рецепторов, снижают выживаемость клеток за счет стимулирования апоптоза при эндометриозе [240]. NOTCH1 - еще один ген, который имеет решающее значение для децидуализации. Снижение Notch сигнализации связано с эндометриозом и способствует нарушению децидуализации за счет снижения экспрессии транскрипционного фактора FOXO1 [241]. Исследования также показали, что сигнальный путь киназы MAPK может быть гиперактивен в эутопическом эндометрии женщин с эндометриозом,

поскольку были выявлены существенные изменения экспрессии компонентов сигнальных каскадов киназ MAPK и PI3K [242; 243]. В нашем исследовании было установлено, что мРНК транскрипты входят в состав киназных путей PI3K/Akt и MAPK, рецепторных каскадов Wnt, Notch, Hedghog, TGF-beta и VEGF, путей биосинтеза простагландинов и молекул фокальной адгезии. Изменение активности данных путей, может приводить к нарушению процессов децидуализации и имплантации.

Было также показано, что ряд указанных генов являются регуляторными мишенями дэ-мкРНК. В частности, валидированными мишенями обнаруженных в ходе исследования дэ-мкРНК являются гены регулирующие процессы пролиферации и дифференцировки, среди которых можно выделить рецепторы (FZD7, KIT, NTRK2, ESR1), киназы (AKT3, PIM1, TP53, PIM1, PLK1), регуляторы клеточного цикла (CDC25, CCNE2) и транскрипционные факторы (GATA4, FOXC1, LEF1, FOXM1, MYB). Важной группой мишеней являются молекулы клеточной адгезии: интегрины (ITGA11, ITGA6), кадерины (CDH1), ламинины (LFVC2), которые могут участвовать в процессах адгезии, инвазии, миграции и эпителиально-мезенхимального перехода.

Исходя из полученных данных по экспрессии микроРНК и мРНК, а также по ассоциированным с ними путям внутриклеточной сигнализации можно предложить схему патогенетических процессов, протекающих в тканях эктопического эндометрия и приводящих к снижению овариального резерва при эндометриоидных кистах яичника.

Снижение ОР – финальная стадия патологического процесса, начинающегося при нормальном ОР.

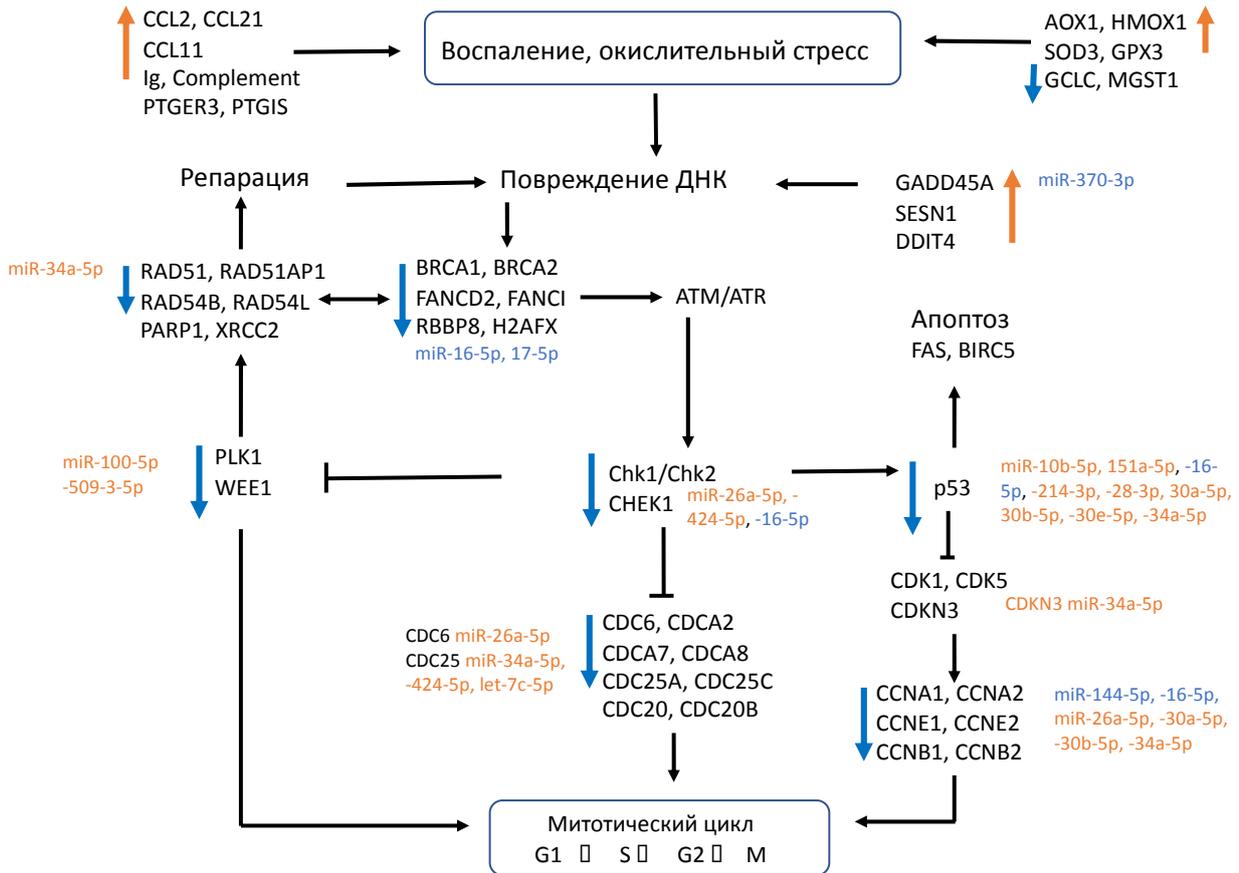


Рисунок 26 – Роль микроРНК и мРНК дифференциально экспрессированных в тканях эктопического эндометрия в регуляции клеточного цикла при повреждении ДНК.

Из представленной схемы следует, что в основе снижения овариального резерва может лежать генотоксическое действие патогенетических факторов со стороны развивающейся кисты. Генотоксический эффект может формироваться за счет воспалительных реакций индуцируемых накоплением лейкоцитов в тканях эктопического эндометрия. В пользу этого свидетельствует повышение экспрессии в тканях кист генов хемокинов (CCL2, CCL11, CCL21), различных вариантов цепей иммуноглобулинов и компонентов комплемента. Также наблюдается повышение экспрессии генов синтеза и рецепции простагландинов, участвующих в реакциях воспаления. Обращает на себя внимание повышение экспрессии генов оксидаз: альдегид оксидазы и гемоксигеназы, повышенная активность которых может приводить к генерации избыточного количества активных форм кислорода. О наличии окислительного стресса в тканях кисты может свидетельствовать повышение экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты, а именно

супероксид дисмутазы и глутатион пероксидазы (SOD3, GPX3). Кроме этого, о возможной недостаточности системы антиоксидантной защиты в тканях кисты может свидетельствовать снижение экспрессии гена фермента биосинтеза глутатиона (GCLC), а также гена MGST1, участвующего в восстановлении гидроперекисей липидов. О генотоксическом действии окислительного стресса свидетельствует повышение экспрессии ряда генов ответа на повреждение ДНК (GAD45A, SESN1, DDIT4). При этом наблюдается снижение экспрессии целого набора генов, белковые продукты которых участвуют в репарации ДНК, что свидетельствует о существенном дисбалансе в работе молекулярных систем, обеспечивающих восстановление повреждений ДНК. Одним из физиологических ответов на повреждение ДНК является остановка митоза за счет изменения активности циклинов (CCN), циклин зависимых киназ (CDK) и фосфатаз (CDC) участвующих в регуляции переходов между стадиями клеточного цикла. Было показано снижение экспрессии генов ряда представителей данных регуляторных белков, при этом в списке данных генов присутствуют как активаторы, так и ингибиторы клеточного цикла. Ключевым эффектором в формировании клеточного ответа на повреждение ДНК является белок p53, который участвует как в остановке клеточного цикла, так и в запуске процессов апоптоза в случае, когда клетка неспособна осуществить репарацию. Экспрессия p53, а также проапоптотических генов FAS и BIRC5 оказалась сниженной в тканях кисты, что может свидетельствовать о неэффективном удалении генетически нестабильных клеток. Для большинства приведенных на схеме генов, по данным биоинформационного анализа были выявлены мкРНК способные регулировать их экспрессию. Необходимо отметить, что большинство указанных мкРНК демонстрировали повышенную экспрессию в тканях кисты, что согласуется со снижением экспрессии регулируемых ими генов. Таким образом, установленные изменения экспрессии генов и мкРНК может свидетельствовать в пользу генетической нестабильности клеток в очаге эндометриоза и окружающих его тканях. Факторы, приводящие к повреждению ДНК в клетках кисты, могут воздействовать на близлежащие ткани яичника, приводя к нарушению регуляции

клеточного цикла в клетках фолликула, а также последующему снижению овариального резерва и бесплодию.

### **Заключение**

Биоинформационный анализ путей и процессов, основанный на полученных транскриптомных данных, показал, что идентифицированные гены могут принимать участие практически во всех аспектах патогенеза эндометриоза. Полученные результаты свидетельствуют о важном вкладе мкРНК в патогенез эндометриоза и сопутствующих ему осложнений, связанных с бесплодием. Наиболее выраженные транскриптомные изменения, в частности свидетельствующие о генотоксическом эффекте, наблюдаются уже при нормальном овариальном резерве. По-видимому, длительное течение процесса приводит к снижению компенсаторных возможностей клеток и преобладанию негативных факторов, приводящих к снижению овариального резерва. Необходимо отметить, что изменение содержания мкРНК и мРНК транскриптов не всегда сопровождается соответствующим изменением содержания целевого белка. При этом взаимодействие мкРНК с мРНК-мишенью может не приводить к деградации последней, поэтому анализ изменения транскриптома может дать только первичную информацию как о возможных мишенях мкРНК (мРНК и их белковых продуктах), так и о возможных изменениях активности путей внутриклеточной сигнализации, в состав которых они входят. Также для большинства установленных в результате анализа экспрессируемых генов отсутствует информация о дифференциальной экспрессии кодируемых ими белков в тканях экторпического и эутопического эндометрия. В этой связи представляется целесообразным наряду с оценкой транскриптома (мкРНК и мРНК), проводить профилирование белкового состава исследуемых тканей, для получения более полной информации о взаимосвязи между дэ-мкРНК и их белковыми мишенями. Тем не менее, приведенный подход представляется перспективным для обобщения данных о многоуровневых молекулярных взаимодействиях, а также для выявления

компонентов сигнальных путей, участвующих в развитии эндометриоза. Дальнейшие исследования с использованием протеомных и биоинформационных технологий, направленные на определение белковых продуктов генов в клетках и тканях эктопического и эутопического эндометрия, позволят составить более полное представление о молекулярных механизмах патогенеза эндометриоза, а также выявить возможные терапевтические мишени для лечения этого заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. У женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ снижение овариального резерва отмечается в 36% случаев до оперативного лечения и в 49% случаев после операции. При исходном уровне АМГ в среднем  $2,92 \pm 1,80$  нг/мл следует ожидать наиболее выраженное снижение овариального резерва в послеоперационном периоде ( $p = 0,00012$ ).
2. Низкий овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ до оперативного лечения ассоциируется с возрастом старше 30 лет, наличием в анамнезе оперативных вмешательств на яичниках, рецидивом ЭКЯ, большим размером ЭКЯ (средний размер  $7,87 \pm 4,70$  см), двусторонним поражением яичников эндометриодными кистами и III – IV степенью распространения эндометриоза ( $p < 0,05$ ). Факторами, ассоциированными со снижением ОР в послеоперационном периоде, являются: двусторонняя резекция яичников ( $p = 0,00001$ ), диаметр кист более 4-х см ( $p = 0,0028$ ), III – IV степень распространения эндометриоза ( $p = 0,0015$ ), исходно низкое количество антральных фолликулов ( $p = 0,026$ ).
3. Одной из основных жалоб среди пациенток с ЭКЯ является бесплодие (39%). Длительность бесплодия более 5 лет достоверно чаще встречается в группе женщин с исходно низким ОР ( $p = 0,01$ ). После операции в группе женщин с исходно нормальным ОР беременность наступает в 46,1% случаев, в группе с исходно низким ОР в 17,9% случаев ( $p = 0,004$ ). Самостоятельная беременность отмечена в 32,9% случаев в I группе и в 5,1% случаев во II группе ( $p = 0,00085$ ). При помощи ВРТ беременность наступала у 10 женщин (13,2%) в I группе и 5 женщин (12,8%) во II группе,  $p = 0,960$ . В 47% случаев попытки ВРТ были неудачными, в связи с отсутствием адекватного ответа яичников на гормональную стимуляцию, отсутствием дробления эмбриона *in vitro*, остановкой развития эмбриона после переноса в полость матки.
4. При низком овариальном резерве на фоне нарушения гормональной функции яичника происходит значительное снижение как количества дифференциально экспрессируемых мкРНК, так и количества дифференциально экспрессируемых

генов в тканях эндометриоидных кист относительно эутопического эндометрия. Полученные данные о малом количестве экспрессированных мкРНК и их генов-мишеней в тканях ЭКЯ группы низкого ОР ассоциированы с более старшим возрастом пациенток данной группы, двусторонним поражением яичников эндометриоидными кистами, III – IV стадией распространения эндометриоза, рецидивом эндометриоидных кист.

5. При помощи биоинформационного анализа установлено, что гены-мишени микроРНК и дифференциально экспрессируемые гены участвуют во внутриклеточных путях, регулирующих процессы воспаления, окислительного стресса, клеточного деления, тканевого ремоделинга, миграции и инвазии, лежащих в основе развития эндометриоидных гетеротопий.
6. Снижение овариального резерва при ЭКЯ на этапе до хирургического лечения обусловлено генотоксическим воздействием эндометриоидной кисты на яичник, о чем свидетельствует как повышение экспрессии генов, участвующих в процессах воспаления и окислительного стресса, так и снижение экспрессии специфических генов, ответственных за репарацию ДНК и регуляцию клеточного цикла. Нарушение указанных процессов может объяснять неудачные попытки ЭКО у пациентов с эндометриоидными кистами яичников.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо проводить оценку ОР всем пациенткам репродуктивного возраста с ЭКЯ на этапе до хирургического лечения. Для оценки ОР используются уровни АМГ, ФСГ и количество антральных фолликулов в яичниках по данным УЗИ. Комплексная оценка овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников до операции и прогнозирование снижения овариального резерва в послеоперационном периоде дает возможность определить объем оперативного лечения и установить тактику ведения данных пациенток в послеоперационном периоде с учетом реализации репродуктивной функции.
2. При проведении оперативного лечения по поводу ЭКЯ необходимо максимально бережно удалять капсулу эндометриоидной кисты, сохраняя здоровую ткань яичника и фолликулярный аппарат. С целью минимизации коагуляционной травмы ткани яичника во время гемостаза биполярную электрокоагуляцию следует начинать с более низкой мощности используя при этом обильное орошение и охлаждение ткани яичника физиологическим раствором. Время экспозиции биполярной энергии должно быть максимально коротким.
3. После операции по поводу ЭКЯ всем пациенткам необходимо оценивать состояние ОР через 3 и 6 месяцев. Состояние овариального резерва до операции, объем эндометриоидных кист и билатеральность поражения яичников, установленные интраоперационно, а также объем выполненного оперативного лечения, позволяют прогнозировать риски снижения овариального резерва в послеоперационном периоде у женщин репродуктивного возраста
4. Женщины репродуктивного возраста с исходно низким ОР, наличием бесплодия в анамнезе, а также те пациентки, у которых были выявлены предикторы снижения ОР в послеоперационном периоде желающие реализовать репродуктивную функцию должны быть до операции консультированы репродуктологами с целью решения вопроса о необходимости использования различных методов сохранения фертильности.

5. Основываясь на полученных данных по изменению уровня экспрессии (повышение) hsa-miR-1-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-202-5p в тканях эутопического эндометрия при низком овариальном резерве можно предложить определение экспрессии данных микроРНК в качестве теста оценки состояния овариального резерва.
6. Был проведен биоинформационный анализ, выявлены гены – потенциальные мишени дэ-мкРНК. Их продукты можно рассматривать в качестве мишеней для таргетной терапии. Изменение экспрессии мкРНК при низком и норм ОВР вносит значительный вклад в экспрессию генов, определяющих патогенетические механизмы развития бесплодия у больных эндометриозом.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

аГнРГ – агонисты гонадотропного рилизинг-гормона

АМГ – антимюллеров гормон

анти-TNF- $\alpha$  – анти-туморнекротический фактор альфа

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дэ-мкРНК – дифференциально экспрессированная микро-рибонуклеиновая кислота

ИА – ингибиторы ароматазы

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ИЛ - интерлейкин

ИР – индекс резистентности

КОК – комбинированные оральные контрацептивы

мкРНК – микро-рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно - резосансная томография

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

НГЭ – наружно – генитальный эндометриоз

ОР – овариальный резерв

ПИ – пульсационный индекс

ПСС – пиковая систолическая скорость

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК –рибонуклеиновая кислота

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФНО – фактор некроза опухоли

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЦОГ – циклооксигеназа

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭКЯ – эндометриоидная киста яичника

AKT - внутриклеточный фермент, один из трёх членов семейства протеинкиназ В.

AFS – Американское общество репродукции

BIRC5 - бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных повторов 5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5), ингибитор апоптоза

CCL2, CCL11, CCL21 – цитокины семейства хемокинов, индуцирующих хемотаксис эозинофилов

CCN – белок из семейства циклинов, специфически регулирующий фазовый переход G1 / S-фаза в клеточном цикле

CDC – циклин зависимые фосфатазы

CDH1 – эпителиальный кадгерин, ген – супрессор опухолей

CDK – циклин зависимые киназы

DDIT4 – повреждение ДНК-индуцируемый транскрипт 4 (DNA-damage-inducible transcript 4), регулирующий ответ ДНК на повреждение

EFI – индекс фертильности при эндометриозе (Endometriosis fertility index)

ERb / ERa - эстрогеновых рецепторов бетта/альфа

ESGE - Европейского общества гинекологической эндоскопии

ESHRE - Европейским обществом репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology)

FAS – белок, кодирующийся одноименным геном, относящимся к проапоптотическим (Fas cell surface death receptor)

FOXO1 – транскрипционный фактор 1

FZD7 - Члены семейства «смятых» генов кодируют белки 7-трансмембранного домена, которые являются рецепторами для сигнальных белков Wnt.

GAD45A - белок и одноименный ген, участвующий в остановке повреждения ДНК

GCLC – глутатион

GPX3 – глутатион пероксидаза 3

HIFU - высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук

ITGA11, ITGA6 – интегрин альфа 11, интегрин альфа 6

JAK/STAT - тирозинкиназа/сигнал-преобразователя и активатора транскрипции  
KIT

LEF1 – лимфоцит связывающий фактор 1 (Lymphoid enhancer-binding factor-1)

MAPKs – митогенные протеинкиназы

MCP - моноцитарный хемоаттрактантный протеин

MGST1 – микросомальная глутатион-S-трансфераза 1

MYB – семейство генов из факторов транскрипции

NFKB – ядерный фактор каппа-B

NGS – секвенирование (next generation sequencing)

NOTCH1 – трансмембранный рецепторный белок человека (Notch homolog 1 translocation-associated)

NTRK2 – нейротрофический рецептор тирозинкиназы 2

PCR – ПЦР в реальном времени

PI3K- фосфатидилинозитол-3-киназы

PGE2 – простагландин E2

PKA – протеинкиназа A

PLK1 – серин/треонин протеинкиназа 1

PR- $\beta$  / PR $\alpha$  - прогестероновые рецепторы бетта/альфа

SERM - селективный модулятор рецептора эстрогена

SESN1 – сестрин 1, цитохром p53 активируемый ген

SPRM – селективный модулятор прогестероновых рецепторов

SOD3 – супероксид дисмутаза 3

TNF $\alpha$  – тумор некротический фактор альфа

TP53 – цитохром p53

TSP-1 - тромбоспондин-1

VEGF-A - сосудистый эндотелиальный фактор роста-A

WES - Всемирного общества эндометриоза (World Endometriosis Society)

Wnt - один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Глубокий инфильтративный эндометриоз: послеоперационные рецидивы и возможные пути их профилактики / Г.Е. Чернуха [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. - №8. – С. 39-46.
2. Поликарпов, А.В. Заболеваемость взрослого населения России в 2017 году. Статистические материалы. Часть III. Министерство здравоохранения Российской Федерации / А.В. Поликарпов, Г.А. Александрова, Н.А. Голубев // Департамент мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения. ФГБУ «Центральный научно – исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России. - Москва 2018 г.
3. Баскаков, В.П. Клиника и лечение эндометриоза: практическое пособие / В.П. Баскаков. – Л.: Медицина, 1990. – 240 с.
4. Fabian M.R. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs / M.R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz // Annual Review of Biochemistry. - 2010. - Vol.1. – С. 351–379.
5. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels / H. Guo [et al.] // Nature. - 2010. - Vol.7308. - P. 835–840.
6. Адамян, Л.В. Генитальный эндометриоз. Современный взгляд на проблему: монография / Л.В. Адамян, С.А. Гаспарян. – Ставрополь, 2004. – 215 с.
7. Современный взгляд на овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников (обзор литературы) / Е.С. Филиппова [и др.] // Проблемы репродукции. – 2017. - №2. – С. 72 – 80.
8. The impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve in patients with unilateral and bilateral endometriomas / S. Alborzi [et al.] // Fertility and Sterility. – 2014. - Vol.2. – P. 427–434.
9. Адамян, Л.В. Эндометриозы: руководство для врачей / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков. – М.: Медицина, 1998. – 320 с.

10. Rokitansky, K. A Manual of Pathological Anatomy / K. Rokitansky. - Philadelphia, Blanchard & Lea, 1855. – 912 p.
11. Russel, W.W. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary / W.W. Russel // Johns Hopkins Hospital Bull. – 1899. - Vol.10. – P. 8 – 10.
12. Benagiano, G. The history of endometriosis / G. Benagiano, I. Brosens, D. Lippi // Gynecologic and Obstetric Investigation. – 2014. - Vol.1. – P. 1 – 9.
13. Semmelink, H.B. Contribution to the knowledge of adenomyoma of the female genital apparatus / H.B. Semmelink, J.R. Josselin // Gynecologic and Obstetric Investigation. - 1905. - Vol.22. – P. 234 – 251.
14. Sampson, J.A. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary / J.A. Sampson // The Archives of Surgery. – 1921. - Vol.3. – P. 245–323.
15. Sampson, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity / J.A. Sampson // The Archives of Surgery. – 1927. - Vol.14. – P. 422 – 469.
16. Schwarz, O.H. Endometrial tissue in the ovary / O.H. Schwarz, R. Crossen // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 1924. - Vol.7. – P. 505–528.
17. Hughesdon, P.E. The structure of endometrial cysts of the ovary / P.E. Hughesdon // J Obstet Gynaecol Br Emp. – 1957. - Vol.44. – P. 481 – 487.
18. Brosens, I.A. The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian chocolate cyst / I.A. Brosens, P.J. Puttemans, J. Deprest // Fertil Steril. – 1994. Vol.61. – P. 1034 – 1038.
19. Nisolle, M. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities / M. Nisolle, J. Donnez // Fertil Steril. – 1997. - Vol.68. – P. 585–596.
20. Clinical and histologic classification of endometriomas. Implications for a mechanism of pathogenesis / F.J. Nezhat [et al.] // Journal of Reproductive Medicine. – 1992. - Vol.9. – P. 771-776.

21. Стрижаков, А.Н. Патогенез, клиника и терапия генитального эндометриоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.01 / Александр Николаевич Стрижаков. – М., 1977. – 46 с.
22. Стрижаков, А.Н. Эндометриоз. Клинические и теоретические аспекты / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов. – М.: Медицина, 1996. – 330 с.
23. Evolution of the Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis / I.A. Brosens [et al.] // Fertility and sterility. – 1985. - Vol.5. – P. 714 – 716.
24. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis / American Society for Reproductive Medicine // Fertility and sterility. – 1997. - Vol.67. – P. 817 – 821.
25. Адамян, Л.В. Эндометриозы / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков. – М.: Медицина, 2006. – 320 с.
26. Adamson, G.D. Endometriosis Fertility Index: is it better then the present staging systems? / G.D. Adamson // Current Opinion in Obstetrics Gynecology. - 2013. - Vol.3. – P. 186-192.
27. Adamson, G.D. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system / G.D. Adamson, D. J. Pasta // Fertility and sterility. – 2010. – Vol.5. – P. 1609 - 1615.
28. Johnson, N.P., Hummelshoj L, Adamson GD, et al. For the World Endometriosis Society Sao Paulo Consortium. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis / N.P. Johnson [et al.] // Human Reproduction. - 2017. - Vol.2. – P. 315 - 324.
29. Ищенко, А.И. Эндометриоз: диагностика и лечение / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина. – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2002. – 104 с.
30. Перитонеальные спайки: от патогенеза до профилактики / В.А. Бурлев [и др.] // Проблемы репродукции. – 2009. – № 3. – С. 36 - 44.
31. Chung, M.K. Interstitial cystitis and endometriosis in patients with chronic pelvic pain: The "Evil Twins" syndrome / M.K. Chung, [et al.] // Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons. – 2005. – Vol.1. – P. 25 - 29.

32. Fraser, I.S. Mysteries of endometriosis pain : Chien-Tien Hsu Memorial Lecture 2009 / I.S. Fraser // The Journal of Obstetric Gynaecology Research. – 2010. – Vol.1. – P. 1-10.
33. Яроцкая, Е.Л. Современные подходы к лечению больных с тазовыми болями в клинике оперативной гинекологии: дис ... д-ра мед. наук: 14.01.01 / Екатерина Львовна Яроцкая. – М., 2004. – 379 с.
34. Porpora, M.G. Correlation between endometriosis and pelvic pain / M.G. Porpora, P.R. Koninckx // The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopist. – 1999. – Vol.4. – P. 429-434.
35. Овакимян А.С. Клиническая, иммуно – морфологическая характеристика хронической тазовой боли при различных формах наружного генитального эндометриоза: дис ... к-та мед наук: 14.01.01 / Ануш Степаевна Овакимян. – М., 2016. – 275 с.
36. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments / S. Ozkan, W. Murk, A. Arici // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. - Vol.1127. – P. 92–100.
37. Эхография органов малого таза Эндометриоз: практическое пособие / В.Н. Демидов [и др.]; под ред. В.Н. Демидова. — М.: Скрипто, 1997. – 60 с.
38. Стрижаков А.Н. Трансвагинальная эхография: 2Д и 3Д методы / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов. – М.: ОСЛН, 2006. – 157 с.
39. Лучевая диагностика и терапия в акушерстве и гинекологии : национальное руководство / Л.В. Адамян, В.Н. Демидов, А.И. Гус. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 656 с.
40. Возможности магнитно – резонансной томографии в визуализации структурных изменений органов малого таза у женщин репродуктивного возраста при бесплодии / О.В. Сергиеня [и др.] // Российский электронный журнал лучевой диагностики. - №1. - 2018. – С. 119 – 128.
41. Giudice, L.C. Clinical practice. Endometriosis / L.C. Giudice // The New England journal of medicine. – 2010. - Vol.25. – P. 2389–2398.

42. Endometriosis and infertility / J. Donnez [et al.] // *Panminerva Medica*. – 2016. Vol.2. – P. 143-50.
43. Risk of adverse pregnancy outcome in endometriosis / I. Brosens [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2012. - Vol.1. – P. 30 – 35.
44. Боярский, К.Ю. Факторы определяющие овариальный резерв / К.Ю. Боярский // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2009. - №2. - С. 65-71.
45. International Glossary on Infertility and Fertility Care / H. Zegers [et al.] // *Fertil. Steril.* - 2017. - Vol.32 (9). – P. 1786 - 1801
46. Age and ovarian reserve are distinct predictive factors of cycle outcome in low responders / J. Galey-Fontaine [et al.] // *Reprod. Biomed. Online*. – 2005. - Vol.10 (1). - 94–99.
47. Денисенко, М.В. Динамика формирования фолликулярного резерва яичников / М.В. Денисенко, М.А. Курцер Л.Ф. Курило // *Андрология и генитальная хирургия*. 2016. - Vol.2. - С. 20 – 28.
48. Gougeon, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / A. Gougeon // *Endocr Rev.* – 1996. - Vol.17(2). – P. 121 – 155.
49. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women, a novel method to assess ovarian reserve / A. Lass [et al.] // *Hum Reprod.* - 1997. - Vol.12 (5). – P. 1028 – 1031
50. Денисенко, М.В., Курцер М.А., Курило Л.Ф. Овариальный резерв и методы его оценки / М.В. Денисенко, М.А. Курцер, Л.Ф. Курило // *Вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии*. – 2016 - №3. - С. 41 – 47.
51. Dynamics of the Ovarian Reserve and Impact of Genetic and Epidemiological Factors on Age of Menopause / E. Pelosi [et al.] // *Biol Reprod.* – 2015. - №92 (5). – P. 1 – 9.
52. Aging of oocyte, ovary, and human reproduction / C. Ottolenghi [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. - Vol.1034. – P. 117–131.
53. Курило, Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих / Л.Ф. Курило. - Deutschland: Lap Lambert Academic Publishing, 2012. - 280 с.

54. Gleicher, N. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging / N. Gleicher, A. Weghofer, D.H. Barad // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2011. – Vol.9(23).
55. Experimental evidence That changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation / C.A. Hodges [et al.] // *Hum Reprod.* – 2002. - Vol.17(5). – P.1171-1180.
56. Ethnicity as a determinant of ovarian reserve: Differences in ovarian aging between Spanish and Indian women / C. Iglesias [et al.] // *Fertil Steril.* - 2014. - Vol.102(1): 244–249.
57. Effect of ethnicity on live birth rates after in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection treatment / K. Jayaprakasan [et al.] // *BJOG.* – 2014. – Vol.121(12). – P. 300–306.
58. Race/ethnic disparities in reproductive age: An examination of ovarian reserve estimates across four race/ethnic groups of healthy, regularly cycling women / M.E. Bleil [et al.] // *Fertil Steril.* - 2014. - Vol.101(1). – P. 199–207.
59. The effect of tuberculosis on ovarian reserve among women undergoing IVF in India / N. Malhotra [et al.] // *Int J Gynaecol Obstet.* – 2012. - Vol.117(1). – P. 40–44.
60. Chemotherapy: Impact on anti-Müllerian hormone levels in breast carcinoma / J. Bala [et al.] // *Clin Diagn Res.* - 2016. - Vol.10(2). – P. 19–21.
61. Obesity adversely affects serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in Caucasian women / V. Moy [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. - Vol.32(9). – P. 1305–1311.
62. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: A review and presentation of original data / S. Firms [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2015. - Vol.13: 134.
63. Combined and interactive effects of global climate change and toxicantson populations and communities / S.J. Moe [et al.] // *Environ Toxicol Chem.* – 2013. - Vol.32(1). – P. 49–61.

64. Elissa, W.P. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction / W.P. Elissa, C. Wong, C. Yan // *Trends Pharmacol Sci.* – 2011. - Vol.32(5). – P. 290–299.
65. Hughesdon, P.E. The structure of endometrial cysts of the ovary / P.E. Hughesdon // *J Obstet Gynaecol Br Emp.* – 1957. - Vol.64 (4). – P. 481–487.
66. The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. / A.M. Sanchez [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2014. - Vol.20(2). – P. 217–230.
67. Matsuzaki, S. Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis / S. Matsuzaki, B. Schubert // *Fertil Steril.* – 2010. - Vol.93(7). – P. 2431–2432.
68. Thrombospondin-1 regulates blood flow via CD47 receptor-mediated activation of NADPH oxidase / G. Csanyi [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2012. - Vol.32(12). – P. 2966–2973.
69. Dolmans M.M, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan W.Y, Torre A. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice / M.M. Dolmans [et al.] // *Reproduction.* - 2007. - Vol.134(2). – P. 253–262.
70. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis / M. Kitajima [et al.] // *Fertil. Steril.* - 2014. - Vol.96 (3). – P. 685–691.
71. Адамян, Л.В. Фолликулогенез яичников женщин с некоторыми формами эндометриоза / Л.В. Адамян, Л.Ф. Курило, И.Ю. Шуляк // *Проблемы репродукции.* 2009. - №1. – С. 78 – 85.
72. Kitajima, M. Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas / M. Kitajima, O. Donnez // *Fertility and Sterility.* – 2014. Vol.4. – P. 21 – 30.
73. Адамян Л.В, Курило Л.Ф, Шуляк И.Ю. Состояние ооцит-фолликулярной системы яичников пациентов с эндометриоидными кистами яичников.

- Проблемы репродукции (специальный выпуск). Третий международный конгресс по репродуктивной медицине. 2009; с. 223.
74. Bulun, S.E. Ovarian Endometriosis: the Nemesis of Eggs / S.E. Bulun // *Fertil Steril.* – 2014. - Vol.101(4). – P. 938–939.
75. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits adhesion of human endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of integrin-mediated mechanisms / J. Lee [et al.] // *Biol Reprod.* - 2013. - Vol.88(3). – P. 1–11.
76. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis / Y.S. Choi [et al.] // *Reproduction.* – 2015. - Vol.149. – P. 155-162.
77. Da Broi, M.G., Oxidative stress and oocyte quality: etiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility / M.G. Da Broi, P.A. Navarro // *Cell Tissue Res.* - 2016. - Vol.364. – P. 1-7.
78. The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis-associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa / M.G. Hull [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. - , 1825–1830.
79. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis B. Xu [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. - Vol.29(5). – P. 10779.
80. Hauzman, E.E. Oocyte donation and endometriosis: What are the lessons? / E.E. Hauzman, J.A. Garcia-Velasco, A. Pellicer // *Semin Reprod Med.* – 2013. - Vol.31 (2). – P. 173-177.
81. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential / E. Fragouli [et al.] // *PLoS Genet.* – 2015. - Vol.11(6).
82. Detrimental effects of endometriosis on oocyte morphology in intracytoplasmic sperm injection cycles: a retrospective cohort study / I. Kasapoglu [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* - 2017. – Vol.23. – P. 1-6.
83. Фолликулогенез при некоторых формах эндометриоза / Л.В. Адамян [и др.] // *Проблемы репродукции.* - 2009. - №4. – С. 78 – 85.

- 84.Эндометриоз и ооциты (обзор литературы) / М.В. Трубицына [и др.] // Проблемы репродукции. - 2018. - №1. - С. 67 – 70.
- 85.Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis / P.T. Goud [et al.] // Fertil Steril. – 2014. - Vol. 102. – P. 151-159.
- 86.Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature / A.M. Sanchez [et al.] // Journal of Ovarian Research. – 2017. - Vol.10. - P. 43.
- 87.Characteristics of follicular fluid in ovaries with endometriomas / E. Giacomini [et al.] // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2017. - Vol.209. – P. 34-38.
- 88.Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. G. Wu [et al.] // J Assist Reprod Genet. - 2017. - Vol.34(3). – P. 357-364.
- 89.Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health / D.A. Dumesic [et al.] // Fertil Steril. – 2015. – Vol.103. – P. 303-316.
- 90.Смольникова, В.Ю. Экстракорпоральное оплодотворение в лечении бесплодия, обусловленного генитальным эндометриозом / В.Ю. Смольникова // Гинекология. - 2004. - №6(2). – С. 84 – 87.
- 91.Баранов, В.С. Экологическая генетика и придикивная медицина / В.С.Баранов // Экологическая генетика. - 2003. - №1. – С. 22 – 29.
- 92.Arvantis, D.A, Goumenou A.G, Matalliotakis M.D. Low-penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis / D.A. Arvantis, A.G. Goumenou, M.D. Matalliotakis // Fertil Steril. – 2001. – Vol.76 (6). – P. 1202 – 1206.
- 93.Курило, Л.Ф. Количественный анализ состава фолликулов яичника при эндометриозе / Л.Ф. Курило, Л.М. Михалева, Л.В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2006. - №3. – С. 53 - 56.
- 94.Dynamics of the Ovarian Reserve and Impact of Genetic and Epidemiological Factors on Age of Menopause / E. Pelosi [et al.] // Biol Reprod. – 2015. – Vol.92(5). – P. 130.

95. Aging of oocyte, ovary, and human reproduction / C. Ottolenghi [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. - Vol.1034. – P. 117–131.
96. Назаренко, Т.А. Оценка овариального резерва у женщин репродуктивного возраста и его значение в прогнозировании успеха лечения бесплодия / Т.А. Назаренко, Н.И. Волков, Н.Г. Мишиева // *Журн. Российского общества акушеров - гинекологов.* - 2005. - №1. - С. 36—39.
97. Назаренко, Т.А, Мишиева Н.Г, Фанченко Н.Д. Ингибин В как маркер овариального резерва у женщин с различными формами бесплодия / Т.А. Назаренко, Н.Г. Мишиева, Н.Д. Фанченко // *Проблемы репродукции.* – 2005. - №1. - С. 15-20.
98. Александрова, Н.В., Марченко Л.А. Современные подходы к оценке овариального резерва у женщин с преждевременной недостаточностью яичников / Н.В. Александрова, Л.А. Марченко // *Проблемы репродукции.* – 2007. - №2. - С. 22 - 29.
99. Baker, S. The role of intraovarian interactions in the regulation of follicle dominance / S. Baker, N. Spears // *Hum. Reprod.* - 1999; Vol.5. – P. 153 – 165.1  
Urman, B. Removal of unilateral endometriomas is associated with immediate and sustained reduction in ovarian reserve / B. Urman, E. Alper, K. Yakin // *Reprod. Biomed Online.* – 2013. – Vol.27(2). – P. 212 – 216.
100. Urman, B. Removal of unilateral endometriomas is associated with immediate and sustained reduction in ovarian reserve / B. Urman, E. Alper, K. Yakin // *Reprod. Biomed Online.* – 2013. – Vol.27(2). – P. 212 – 216.
101. Dewailly, D. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women // D. Dewailly [et al.] // *Human Reprod Update.* – 2014. – Vol.20. – P. 370–85.
102. ESHRE consensus on the definition of poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria / A.P. Ferraretti [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. - Vol.26(7). – P. 1616-1624.

103. In women with endometriosis anti-Müllerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery / I. Streuli [et al.] // *Hum Reprod.* - 2012. - Vol.27(11). – P. 3294-303.
104. Ercan, C. Antimüllerian hormone levels after laparoscopic endometrioma / C. Ercan, M. Sakinci // *Gynecological Endocrinology.* – 2010. – Vol.26(6). – P. 468–472.
105. Lemos, N.A. Decreased AMH and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis / N.A. Lemos, E. Arbo, R. Scalco // *Fertil. Steril.* - 2008. – Vol.89 (5). – P. 1064-1068.
106. Hwu Y. The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on serum AMH levels / Y. Hwu, F. Wu, S. Le // *Reprod Biol Endocrin.* - 2011. – Vol. 9. – P. 9-18.
107. Kim, V.N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function / V.N. Kim // *Mol Cells.* - 2005. – Vol.19. – P. 1–15.
108. MicroRNA expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. L.A Ramón [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011/ - Vol.26(5). – P.1082-1090.
109. Functional MicroRNA involved in endometriosis. S.M. Hawkins [et al.] // *Mol Endocrinol.* - 2011. – Vol.25(5). – P. 821-32.
110. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells / N. Kosaka [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol.285(23). – P.17442–52.
111. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis / X. Yang [et al.] // *Reproduction.* – 2012/ - Vol.144. – P. 235–44.
112. Cloning and analysis of fetal ovary microRNAs in cattle / S.K. Tripurani [et al.] // *Anim Reprod Sci.* – 2010/ - Vol.120/ - P.16–22.
113. MicroRNA-181a suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IIA / Q. Zhang [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol.8 (3).
114. MiR-26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting ATM during follicular atresia in porcine ovary / F. Lin [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol.7 (6).

115. MicroRNA-22-3p is downregulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure / Y. Dang [et al.] // *Fertil Steril.* – 2015. – Vol.103(3). – P. 802–7.
116. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis / T.Z. Jacobson [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2010. - Vol.1.
117. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata / R.J. Hart [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* - 2008. – Vol.2.
118. Ovarian endometrioma: postoperative adhesions following bipolar coagulation and suture/ M. Pellicano [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – Vol.89. – P. 796–799.
119. Surgical treatment of ovarian endometriomas: state of the art? / P. Jadoul [et al.] // *Fertil Steril.* – 2012. – Vol.98. – P. 556-563.
120. Pathophysiology proposed as the basis for modern management of the ovarian endometrioma / I. Brosens [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2014. – Vol.28(2). – P. 232-238.
121. Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev.* – 2014. – Vol.10(3).
122. Ovarian surgery for bilateral endometriomas influences age at menopause / M.E. Coccia [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol.26. – P. 3000–3007.
123. Analysis of late-onset ovarian insufficiency after ovarian surgery: retrospective study with 75 patients of post-surgical ovarian insufficiency / S. Takae [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9(5).
124. Raffi, F. The impact of excision of ovarian endometrioma on ovarian reserve: a systematic review and meta-analysis / F. Raffi, M. Metwally, S. Amer // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol.97. – P. 3146–54.
125. Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: a systematic review on serum antimüllerian hormone level modifications / E. Somigliana [et al.] // *Fertil Steril.* – 2012. – Vol.98. – P. 1531–1538.
126. Kitajima, M. Changes in serum AMH levels may predict damage to residual normal ovarian tissue after laparoscopic surgery for women with ovarian

- endometrioma / M. Kitajima, K.N. Khan // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol.96(3). – P. 685 – 691.
- 127.Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация: Клинические рекомендации по ведению больных / Л.В. Адамян [и др.]; под ред. Л.В. Адамян. – М.: Медицина, 2013. – 62 с.
- 128.Neil, P.J. Consensus on current management of endometriosis for the World Endometriosis Society Montpellier Consortium / P.J. Neil, L. Hummelshoj // *Hum Reprod.* – 2013. – Vol.25.
- 129.Kitajima, M. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis / M. Kitajima, M. Dolmans, J. Donnez // *Fertility and Sterility.* – 2011. – Vol.96(3). – P. 685 – 691.
- 130.The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on ovarian reserve and the exploration of related factors assessed by serum anti-Mullerian hormone: a prospective cohort study / J. Chen [et al.] // *J Ovarian Res.* - 2014. – Vol.7:108.
- 131.Anti-Müllerian hormone reduction after ovarian cyst surgery is dependent on the histological cyst type and preoperative anti-Müllerian hormone levels / T. Lind [et al.] // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2015. – Vol.94(2). – P. 183-190.
- 132.Long - term adjuvant therapy for the prevention of postoperative endometrioma recurrence: a systematic review and meta-analysis / P. Vercellini [et al.] // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2013. – Vol.92. – P. 8–16.
- 133.Guo, S.W. Recurrence of endometriosis and its control / S.W. Guo // *Hum Reprod.* - 2009. – Vol.15. – P. 441– 461.
- 134.Давыдов, А.И. Оценка овариального резерва после эндохирургических вмешательств на яичниках с использованием высоких энергий / А.И. Давыдов, Р.Д. Мусаев // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2011. - №10(3). – С. 56-63.
- 135.Antimullerian Hormone Level and Endometrioma Ablation Using Plasma Energy / H. Roman [et al.] // *JSLS.* – 2014. – Vol.18(3).
- 136.Давыдов, А.И. Возможности и перспективы применения плазменной хирургии нового поколения при операциях на яичниках / А.И. Давыдов,

- О.В. Чабан // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2012. - № 2. - С. 51-57.
- 137.Эффективность применения аргоноплазменной коагуляции в акушерстве и гинекологии / А.С. Гаспаров // Российский вестник акушера – гинеколога. - 2011. - №2. - С. 33 – 36.
- 138.Давыдов А.И., Чабан О.В. Эндометриома или эндометриоидная киста? Как сохранить ткань яичника и избежать злокачественной трансформации. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2012. - № 4. - С. 79-91.
- 139.Vaporization of ovarian endometrioma using plasma energy: Histologic findings of a pilot study / Н. Roman [et al.] // Fertil Steril. – 2011. – Vol.95. – P. 1853-1856.
- 140.Long-term outcome, including pregnancy rate, recurrence rate and ovarian reserve, after laparoscopic laser ablation surgery in infertile women with endometrioma / Y. Schimizu [et al.] // J Obstet Gynaecol Res. – 2010. Vol.36(1). – P. 115–118.
- 141.Кулаков, В.И. Эндоскопия в гинекологии: Руководство для врачей / В.И. Кулаков, Л.В. Адамян. - М.: Медицина, 2000. – 384 с.
- 142.Laparoscopic management of endometriomas using a combined technique of excisional (cystectomy) and ablative surgery / J.Donnez [et al.] // Fertil Steril. – 2010. – Vol.94(1). – P. 28–32.
- 143.Sonographic changes after laparoscopic cystectomy compared with three-stage management in patients with ovarian endometriomas: a prospective randomized study / G. Pados [et al.] // Hum Reprod. – 2010. – Vol.25(3). – P. 672–677.
- 144.Assessment of ovarian reserve after cystectomy versus ‘one-step’ laser vaporization in the treatment of ovarian endometrioma: a small randomized clinical trial / M. Candiani [et al.] // Human Reproduction. – 2018. – Vol.33. – P. 2205–2211.

145. Strategies and surgical management of endometriosis: CNGOF-HAS Endometriosis Guidelines / H. Roman [et al.] // *Gynecol Obstet Fertil Senol.* – 2018. – Vol.46(3). – P. 326-330.
146. Treatment efficacy for pain complaints in women with endometriosis of the lesser pelvis after laparoscopic electroablation / E. Posadzka [et al.] // *CO2 laser ablation Lasers in Medical Science.* – 2015. – Vol.30. – P. 147–152.
147. Recommendations for the surgical treatment of endometriosis—part 1: ovarian endometrioma / E. Saridogan [et al.] // *Gynecol Surg.* – 2017. – Vol.14(1). – P. 27.
148. Andreas, D. Laparoscopic ovarian cystectomy without bipolar coagulation or sutures using a gelatine–thrombin matrix sealant / D. Andreas, A.H. Ebert, N. Fuhr // *Arch Gynecol Obstet.* – 2009. – Vol.280. – P. 161–165.
149. The possibility of using a new matrix hemostatic sealant (FloSeal) to achieve hemostasis in laparoscopic removal of the endometrioma / R. Angioli [et al.] // *J Minim Invasive Gynecol.* - 2009. – Vol.16. – P. 153 – 156.
150. The use of fibrin sealant (Tisseel) in laparoscopic excision of ovarian endometrioma / YC. Liu [et al.] // *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.* – 2017. – Vol.56. – P. 342 – 345.
151. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome / F.J. Broekmans [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2006. - Vol.12. – P. 685 - 718.
152. The presence of ovarian endometriomas is associated with a reduced responsiveness to gonadotropins / E. Somigliana [et al.] // *Fertil Steril.* – 2006. – Vol.86. – P. 192 - 196.
153. IVF-ICSI outcome in women operated on for bilateral endometriomas / E. Somigliana [et al.] // *Hum Reprod.* – 2008. - Vol.23. – P. 1526 – 1530.
154. Impact of ovarian endometrioma on assisted reproduction outcomes / S. Gupta [et al.] // *Reprod Biomed Online.* - 2006. - Vol.13. – P. 349 – 360.

155. Damage to ovarian reserve associated with laparoscopic excision of endometriomas: a quantitative rather than a qualitative injury / G. Ragni [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2005. – Vol.19. – P. 1908 – 1914.
156. Surgical diminished ovarian reserve after endometrioma cystectomy versus idiopathic DOR: comparison of in vitro fertilization outcome / A. Roustan [et al.] // *Hum Reprod.* – 2015. – Vol.30. – P. 840–847.
157. In vitro fertilization outcomes in women with surgery induced diminished ovarian reserve after endometrioma operation: comparison with diminished ovarian reserve without ovarian surgery / S.B. Hong [et al.] // *Obstet Gynecol Sci.* – 2017. – Vol.60. – P. 63–68.
158. Prognostic factors for assisted reproductive technology in women with endometriosis-related infertility / C. Maignien [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2017. – Vol.216. – P.280.
159. Смольникова, В.Ю. Экстрокорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов в полость матки в лечении бесплодия, обусловленного генитальным эндометриозом (клинические и эмбриологические аспекты): дис.....докт. мед. наук: 14.00.01. / Вероника Юрьевна Смольникова. – М., 2002 – 264 с.
160. Effect of second-line surgery on in vitro fertilization outcome in infertile women with ovarian endometrioma recurrence after primary conservative surgery for moderate to severe endometriosis / H. Park [et al.] // *Obstet Gynecol.* – 2015. – Vol.58. – P.481–486.
161. Impact of stage III–IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study / I. Díaz [et al.] // *Fertil Steril.* – 2000. – Vol.74. – P. 31–34.
162. Oocyte competence in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection patients suffering from endometriosis and its possible association with subsequent treatment outcome: a matched case-control study / O. Shebl [et al.] // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2017. – Vol.96. – P. 736–744.

163. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis / H.M. Harb [et al.] // *BJOG*. – 2013. – Vol.120. – P. 1308–1320.
164. European Society of Human Reproduction and Embryology. ESHRE guideline: management of women with endometriosis / G.A. Dunselman [et al.] // *Hum Reprod*. – 2014. – Vol.29(3). – P. 400-412.
165. Could surgical management improve the IVF outcomes in infertile women with endometrioma? / H.J. Park [et al.] // *Obstet Gynecol*. - 2019. – Vol.62(1). – P. 1–10.
166. Garry, R. The effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis / R. Garry [et al.] // *Curr Opin Obstet Gynecol*. – 2004. – Vol.16. – P. 299–303.
167. Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis / P. Vercellini [et al.] // *Hum Reprod Update*. – 2011. - Vol.17. – P.159 - 170.
168. Long-term cyclic and continuous oral contraceptive therapy and endometrioma recurrence: a randomized controlled trial / R. Seracchioli [et al.] // *Fertil Steril*. - 2010. – Vol.93. P. 52–56.
169. Schindler, A.E. Dienogest in long-term treatment of endometriosis / A.E. Schindler // *Int J Womens Health*. – 2011. – Vol.3. – P. 175-84.
170. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture / K. Yamanaka [et al.] // *Fertil Steril*. – 2012. – Vol.97(2). – P. 477-482.
171. Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis / A. Hayashi [et al.] // *J Ovarian Res*. – 2012. – Vol.5(1). – P. 31.
172. Safety and tolerability of dienogest in endometriosis: pooled analysis from the European clinical study program / T. Strowitzki [et al.] // *Int J Womens Health*. – 2015. – Vol.7. – P. 393-401.

- 173.Pavone, M.E., Bulun S.E. Aromatase inhibitors for the treatment of endometriosis / M.E. Pavone, S.E. Bulun // *Fertil Steril.* - 2012. – Vol.98(6). – P. 1370-1379.
- 174.Effects of different add-back regimens on hypoestrogenic problems by postoperative gonadotropin-releasing hormone agonist treatment in endometriosis / D.Y. Lee [et al.] // *Obstet Gynecol Sci.* – 2016. – Vol.59(1). – P. 32-38.
- 175.Agarwal, S.K. Reduction in Endometrioma Size with Three Months of Aromatase Inhibition and Progestin Add-Back / S.K. Agarwal, W.G. Foster // *Biomed Res Int.* – 2015.
- 176.Advances in pharmacotherapy for treating endometriosis / E. Tafi [et al.] // *Expert Opin Pharmacother.* – 2015. – Vol.16(16).
- 177.TNFR: Fc Suppresses the Development of Endometriosis in a Mouse Model by Downregulating Cell Proliferation and Invasiveness / Y. Liu [et al.] // *Reprod Sci.* – 2016. – Vol.23(7). – P. 847-857.
- 178.Treatment with bazedoxifene and conjugated estrogens results in regression of endometriosis in a murine model / H. Naqvi [et al.] // *Biol Reprod.* – 2014. – Vol.90(6). – P. 121.
- 179.Goyeneche, A.A. Antiprogestins in gynecological diseases / A.A. Goyeneche, C.M. Telleria // *Reproduction.* – 2015. – Vol.149(1). – P. 15-33.
- 180.Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis / H.M. Sallam [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2006.
- 181.Could surgical management improve the IVF outcomes in infertile women with endometrioma?: a review / H.J. Park [et al.] // *Obstet Gynecol Sci.* – 2019. – Vol.62(1). – P. 1–10.
- 182.Dienogest treatment after ovarian endometrioma removal in infertile women prior to IVF / V. Muller [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2017. – Vol.33. – P. 18–21.
- 183.In vitro fertilization success rates after surgically treated endometriosis and effect of time interval between surgery and in vitro fertilization / B. AlKudmani [et al.] // *J Minim Invasive Gynecol.* – 2018. – Vol.25. - P. 99–104.

184. Effect of surgery on ovarian reserve in women with endometriomas, endometriosis and controls / L.R. Goodman [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2016. – Vol.215.
185. Assessment of ovarian reserve by antral follicle count in ovaries with endometrioma / M.L. Lima [et al.] // *Ultrasound Obstet Gynecol.* – 2015. – Vol.46(2). – P. 239-242.
186. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women / D. Dewailly [et al.] // *Hum Reprod.* - 2014. – Vol.20(3). – P. 370 - 385.
187. Согоян, Н.С. Роль антимюллера гормона в репродуктивной системе женщин (обзор литературы) / Н.С. Согоян, И.Ф. Козаченко, Л.В. Адамян // *Проблемы репродукции.* - 2017. - №1. - С. 37-42.
188. Antral follicle count (AFC) and serum anti-Müllerian hormone (AMH) are the predictors of natural fecundability have similar trends irrespective of fertility status and menstrual characteristics among fertile and infertile women below the age of 40 years / H.L. Khan [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2019. – Vol.17(1). – P. 20.
189. Multi-centre studies of the global impact of endometriosis and the predictive value of associated symptoms / K.E. Nnoaham [et al.] // *J Endometr.* – 2009. – Vol.1(1). P. 36-45.
190. Surgical Therapy of Ovarian Endometrioma: Recurrence and Pregnancy Rates / V. Lara [et al.] // *JSLs.* – 2014. – Vol.18(3).
191. The role of fertility preservation in patients with endometriosis / L. Carrillo [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – Vol.33(3). – P. 317–323.
192. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Mature oocyte cryopreservation: a guideline / *Fertil Steril.* - 2013. – Vol.99(1). – P. 37–43.
193. MicroRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors / L.A. Ramón [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. - Vol.26. – P. 1082–1090.

194. MiR-191 modulates malignant transformation of endometriosis through regulating TIMP3 / M. Dong [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2015. – Vol.21. – P. 915–20.
195. Graham, A. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival / A. Graham, T. Falcone, W.B. Nothnick // *Hum. Reprod.* – 2015. – Vol.30. – P. 642–52.
196. MicroRNA23a and MicroRNA23b Deregulation Derepresses SF-1 and Upregulates Estrogen Signaling in Ovarian Endometriosis / L. Shen [et al.] // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol.98. – P.1575–1582.
197. MiR-29c is downregulated in the ectopic endometrium and exerts its effects on endometrial cell proliferation, apoptosis and invasion by targeting c-Jun / M. Long [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2015. – Vol.35. – P. 1119–1125.
198. The differential expression of microRNA-143,145 in endometriosis / B. Zheng [et al.] // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2014. – Vol.12. – P. 555–560.
- 199.1 High throughput sequencing approach uncovers the miRNome of peritoneal endometriotic lesions and adjacent healthy tissues / M. Saare [et al.] // *PLoS One.* – 2014/ Vol.9.
200. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis / E.M.C. Ohlsson Teague [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2009. – Vol.23. – P. 265–275.
201. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis / N. Filigheddu [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010.
202. Functional microRNA involved in endometriosis / S.M. Hawkins [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2011. – Vol.25. – P. 821–832.
203. Downregulation of miR-183 inhibits apoptosis and enhances the invasive potential of endometrial stromal cells in endometriosis / X.Y. Shi [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2014. – Vol.33. – P. 59–67.
204. Microarray analysis of microRNA deregulation and angiogenesis-related proteins in endometriosis / R. Yang [et al.] // *Genet Mol Res.* – 2016. – Vol.15.

205. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors / A. Braza-Boils [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol.29/ - P. 978–988.
206. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression / Q. Pan [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2007/ - Vol.13. – P. 797–806.
207. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium / S. Kuokkanen [et al.] // *Biol Reprod.* – 2010/ - Vol.82. – P. 791–801.
208. Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P, Cucuianu A, Berindan-Neagoe I, Calin GA. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology / C. Braicu [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2015. – Vol.22(1). – P. 34-45.
209. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: A new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation / Y.H. Ng [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol.8(3).
210. Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis / A. Braza-Boils [et al.] // *Hum Reprod.* – 2015. – Vol.30(10). – P. 2292-302.
211. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis / X. Yang [et al.] // *Reproduction.* – 2012. – Vol.144. – P. 235–244.
212. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis / X. Yang [et al.] // *Reproduction.* – 2012. – Vol.144. – P. 235–244.
213. Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Young SL, Lessey BA, Tayade C. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril* / S.P. Monsanto [et al.] // 2016. – Vol.105(4). – P. 968-977.
214. Increased expression of interleukin-1 receptor type 1 in active endometriotic lesions / C. Lawson [et al.] // *Reproduction.* – 2007. – Vol.133(1). – P. 265-274.

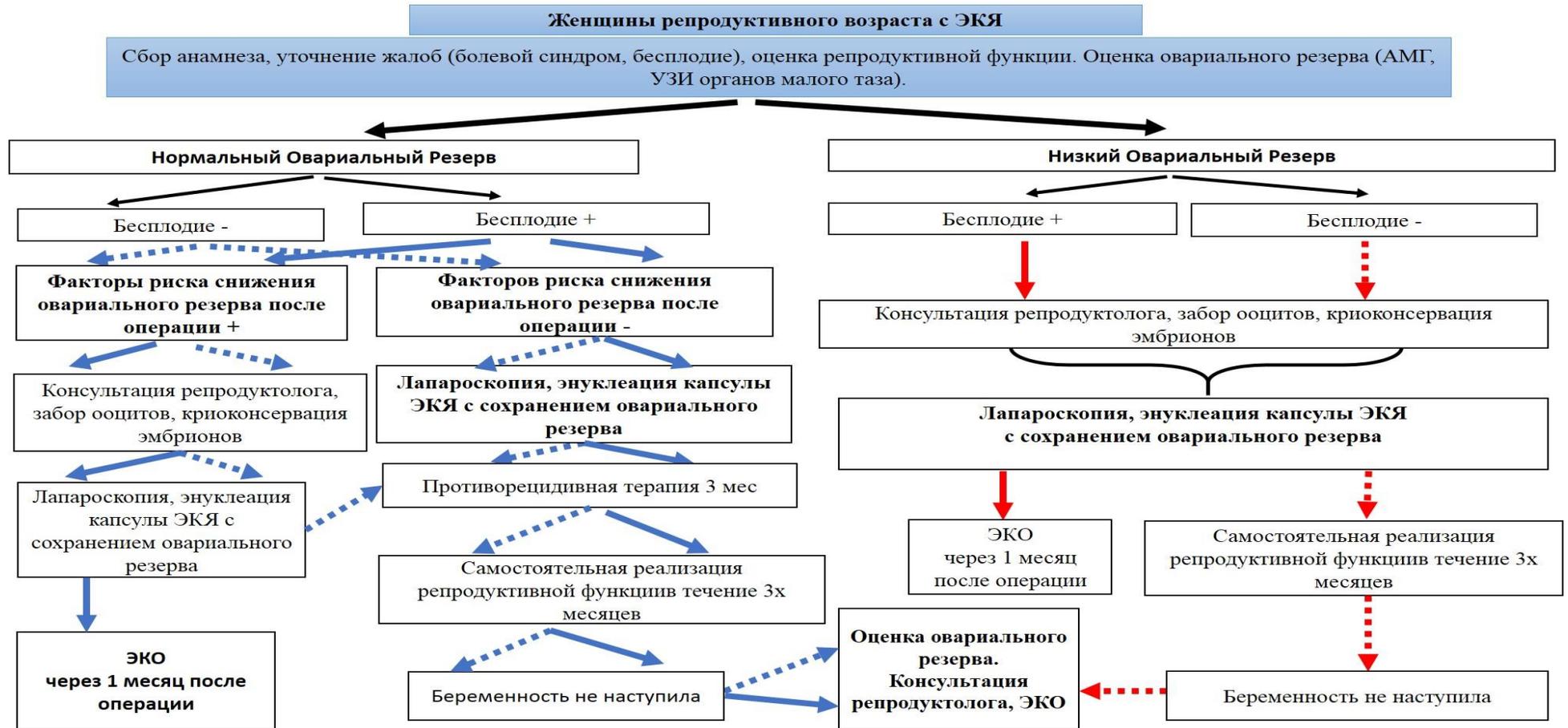
215. Tosato, G. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes / G. Tosato, K.D. Jones // *Blood*. – 1990. – Vol.75(6). – P. 1305-1310.
216. Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to oestradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro / A. Akoum. [et al.] // *Mol Hum Reprod*. – 2001. – Vol.7(9). – P. 859-866.
217. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta / D.I. Lebovic [et al.] // *Mol Hum Reprod*. – 2000. – Vol.6. – P.269–75.
218. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients / F. Chishima [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2002. – Vol.48(1). – P. 50-56.
219. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis / H. Ota [et al.] // *Hum Reprod*. – 2001. – Vol.16(3). – P. 561-566.
220. Prostaglandin E2: the master of endometriosis? / M.H. Wu [et al.] // *Exp Biol Med* (Maywood). – 2010. – Vol.235(6). – P. 668-677.
- 221.1 Kouro, T. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy / T. Kouro, K. Takatsu [et al.] // *Int Immunol*. – 2009. – Vol.21(12). – P. 1303-1309.
222. Increased IL-7 expression in Vogt-Koyanagi-Harada disease / Y. Yang [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2012. – Vol.53(2). – P. 1012-1017.
223. Eisenberg VH, Zolti M, Soriano D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev*. 2012 11(11):806-14.
224. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production/ A. Pellicer [et al.] // *Fertil Steril*. – 1998. – Vol.70. – P. 425–431.
225. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis / N. Garrido [et al.] // *Hum Reprod*. – 2000. – Vol.6. – P. 67–74.

226. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality / A. Pellicer. [et al.] // *J Reprod Fertil Suppl.* – 2000. – Vol.55. – P. 109–119.
227. Endometriosis and oocyte quality / H. Saito [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* – 2002. – Vol.53(1). – P. 46–51.
228. A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis / S. Yoshida [et al.] // *Hum Reprod.* – 2004. – Vol.19. – P.1821–1825.
229. Ulukus, M. The role of endometrium in endometriosis / M. Ulukus, H. Cakmak, A. Arici // *J Soc Gynecol Investig.* – 2006. Vol.13. – P. 467–476.
230. Guerin, P. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings / P. Guerin, S. Mouatassim, Y. Menezo // *Hum Reprod Update.* – 2001. – Vol.7. – P. 175–189.
231. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis / G. Mansour [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – Vol.91(5). – P. 2079–2086.
232. Han, S.J. The dynamics of nuclear receptors and nuclear receptor coregulators in the pathogenesis of endometriosis / S.J. Han, B.W. O'Malley // *Hum Reprod Update.* 2014. – Vol.20(4). – P. 467–484.
233. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis / S.E. Bulun [et al.] // *Semin Reprod Med.* – 2010. – Vol.28(1). – P. 36–43.
234. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol / S.E. Bulun [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* – 2006. – Vol.248(1-2). – P. 94–103.
235. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis / F.M. Reis [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2013. – Vol.19(4). – P. 406–418.

- 236.Susheelamma, C.J. Oestrogen, progesterone and stem cells: the discordant trio in endometriosis? / C.J. Susheelamma, S.M. Pillai, S. Asha Nair // *Expert Rev Mol Med.* – 2018. – Vol.20.
- 237.Human endometrial fibroblasts derived from mesenchymal progenitors inherit progesterone resistance and acquire an inflammatory phenotype in the endometrial niche in endometriosis / F. Barragan [et al.] // *Biology of Reproduction.* – Vol.94. – Vol.118. – P. 1-20.
- 238.Lessey, B.A. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why / B. A. Lessey, J.J. Kim // *Fertil Steril.* – 2017. – Vol.108(1). – P. 19-27.
- 239.Inhibition of AKT with the orally active allosteric AKT inhibitor, MK-2206, sensitizes endometrial cancer cells to progestin / A. Pant [et al.] // *PLoS One.* - 2012. - Vol.7.
- 240.Increased AKT or MEK1/2 activity influences progesterone receptor levels and localization in endometriosis / J.L. Eaton [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* . – 2013. – Vol.98. – P. 1871–1879.
- 241.Decreased Notch pathway signaling in the endometrium of women with endometriosis impairs decidualization / R.W. Su [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2015. – Vol.100. – P. 433–442.
- 242.Increased mitogenactivated protein kinase kinase/extracellularly regulated kinase activity in human endometrial stromal fibroblasts of women with endometriosis reduces 30,50-cyclic adenosine 50-monophosphate inhibition of cyclin D1 / M.C. Velarde [et al.] // *Endocrinology.* – 2009. – Vol.150. – P. 4701–4712.
- 243.Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis / S. Matsuzaki [et al.] // *Fertil Steril.* – 2006. – Vol.86. – P.: 548–53.

## Приложение А

### Тактика ведения женщин репродуктивного возраста с ЭКЯ



Нормальный овариальный резерв, бесплодие в анамнезе →  
 Нормальный овариальный резерв, нет бесплодия - - - - -  
 Низкий овариальный резерв, нет бесплодия - - - - -  
 Низкий овариальный резерв, бесплодие в анамнезе →

## Приложение Б

Схема патогенетических процессов, протекающих в тканях эктопического эндометрия и приводящих к снижению овариального резерва при эндометриоидных кистах яичника

