

На правах рукописи

ЩЕРБАКОВА ЛИЯ НИЯЗОВНА

**НАРУЖНЫЙ ГЕНИТАЛЬНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ И
РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПОТЕЦИАЛ**

14.01.01 - акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

МОСКВА-2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном общеобразовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Панина Ольга Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Давыдов Александр Ильгизирович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, профессор

доктор медицинских наук, профессор

Гаспаров Александр Сергеевич

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», кафедра акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины факультет непрерывного медицинского образования врачей, профессор

доктор медицинских наук, профессор

Назаренко Татьяна Алексеевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт репродуктивной медицины, директор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__»_____ 2020 г в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.15 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте: <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан «__»_____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Хашукоева Асият Зульфичовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Без всякого сомнения одним из основных вызовов современной гинекологии в целом и репродуктологии, в частности, является проблема infertility. Несмотря на огромные успехи вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), количество остающихся бесплодными пар в промышленно развитых странах не уменьшается.

Одним из значимых факторов женского бесплодия является эндометриоз. Патологически эндометриоз является хроническим асептическим воспалительным состоянием, которое очень часто сопряжено со снижением фертильности [Адамян Л.В. и др., 2018; Tanbo et al., 2017]. Распространенность эндометриоза у пациенток с бесплодием оценивается по данным различных исследователей от 25 до 40% [Адамян Л.В. и др., 2017; Guideline, 2017; Guardo Di et al., 2019]. Между тем, эндометриоз до сих пор остается «загадочным» заболеванием. Его патогенез и механизмы, приводящие к развитию бесплодия, продолжают активно изучаться во всем мире. В литературе освещаются вопросы, касающиеся этиологии и патогенеза эндометриоза, классификации, диагностики, выбора тактики ведения пациенток с различными формами эндометриозной болезни [Давыдов А.И. и др., 2019; Леваков С.А. и др., 2019; Оразов М.Р. и др., 2019; Adamson et al., 2010; Asghari et al., 2018; Cecchino et al., 2018; Tomassetti et al., 2019].

Восстановление репродуктивной функции у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием представляет серьезную проблему для гинекологов. Связано это с многофакторным и многогранным влиянием эндометриоза на фертильность. Эндометриоз может существовать в различных формах: от нескольких имплантатов на тазовой брюшине до обширного спаечного процесса, двустороннего поражения яичников и инфильтрации соседних органов. Долгое время предполагалось, что клинические проявления (боль, бесплодие) эндометриоза коррелируют со степенью его распространенности. Однако тяжелые инфильтративные формы с поражением параметральной клетчатки и вовлечением в этот процесс мочеточника или даже большие эндометриозные кисты яичников долгое время могут протекать бессимптомно, а манифестировать с признаков обструкции мочеточника или с разрыва эндометриозной кисты [Carneiro et al., 2017; Daraï et al., 2017]. Известны также и единичные наблюдения самопроизвольного наступления беременности у пациенток с

эндометриоидными кистами яичников, с поражением ректовагинальной клетчатки, тогда как во множестве ситуаций наличие всего нескольких эндометриоидных гетеротопий на тазовой брюшине приводит к бесплодию [Герасимова А.А. и др., 2013; Манухин И.Б. и др., 2017; Cecchino et al., 2018; Máté et al., 2018]. И если очевидно, что распространенный процесс с адгезивным поражением малого таза может привести к бесплодию из-за анатомо-топографических нарушений, то при отсутствии серьезных механических препятствий при умеренном эндометриозе необходимо рассмотреть альтернативные механизмы развития эндометриоз-ассоциированного бесплодия [Тихомиров А.Л., 2016; Зайратьянц О.В. и др., 2018; Давыдов А.И. 2019; Koninckx et al., 2019]. Эти же патогенетические механизмы, приводящие к развитию бесплодия при эндометриозе, могут стать и причиной неудач в программах ВРТ [Назаренко Т.А. и др., 2019; Takashima et al., 2017; Vassilopoulou et al., 2018].

По сути наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) затрагивает все звенья, определяющие репродуктивный потенциал. У пациенток с эндометриозом выявляются нарушения на системном уровне, выражающиеся в дисрегуляции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси. Большой вклад в развитие эндометриоз-ассоциированного бесплодия вносят нарушения процессов созревания фолликулов, овуляции и дисфункция желтого тела [Дубинская Е.Д., 2017; Трубицына М.В. и др., 2018; Senapati et al., 2016; Ferrero et al., 2017]. Снижение вероятности оплодотворения связано с локальными изменениями в полости малого таза и составе перитонеальной жидкости, приводящие к сперматотоксичности, затруднениям слияния сперматозоида и яйцеклетки [Polak et al., 2018; Broi et al., 2019; Rolla, 2019]. Преимплантационные потери связаны с низким качеством эмбрионов, а снижение рецептивности эндометрия приводит к нарушению процессов имплантации [Назаренко Т.А., 2019; Lessey et al., 2017; Özcan et al., 2019]. То есть эндометриоз является своего рода «оккупантом» в организме – размножаясь, подавляет единственную функцию, которая может его излечить – беременность.

В настоящее время причины, приводящие к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия, рассматриваются на клеточном и молекулярном уровнях. Известно, что эндометриоз сопровождается развитием хронического воспаления в брюшной полости с привлечением большого количества лейкоцитов [Гаспаров А.С., 2019; Lin et al., 2018; Rolla, 2019]. Многочисленные клетки воспалительного ответа секретируют различные

провоспалительные медиаторы: цитокины, хемокины, факторы роста, активные формы кислорода (АФК), что в свою очередь вызывает нарушение свободно-радикального гомеостаза в брюшной полости [Каракашян Н.Р. и др., 2016; Волгина Н.Е. и др., 2016; Asghari et al., 2018; Lu et al., 2018; Montoya-Estrada et al., 2019]. Прогресс в области молекулярной медицины постепенно приводит ученых к новому пониманию роли свободных радикалов в жизнедеятельности клетки, ткани, органа и организма в целом. Свободные радикалы являются участниками многих сигнальных путей, в частности служат триггером гибели клетки с поврежденной ДНК, а в некоторых ситуациях наоборот, обеспечивают их выживаемость [Безруков Е.А. и др., 2016; Проскурнина Е.В., 2018; Taguchi et al., 2016].

Многие годы в качестве единственного патологического состояния, сопровождающегося выработкой большого количества свободных радикалов и сниженной продукцией антиоксидантов, рассматривался оксидативный стресс [Владимиров Ю.А., 2009; Vecatti et al., 2018; Lu et al., 2018]. По сути, оксидативный стресс является финальным «аккордом» жизнедеятельности каждой клетки. Однако в настоящее время оксидативный стресс не должен рассматриваться исключительно как патологический процесс, потому что как только в клетке возникает риск потери интактности ДНК, то вступает в действие принцип, определенный В.П. Скулачевым (2001) как "самурайский закон биологии": "Лучше умереть, чем ошибиться", то есть любая клетка готова к самоликвидации ради сохранения целостности организма. Точно так же повышенный уровень антиоксидантов не всегда является прогностически благоприятным фактором, так как он отражает компенсаторную активацию антиоксидантной системы на увеличение свободных радикалов и может позволять клеткам с нарушениями ДНК и других программ высокой степени сложности избежать гибели [Бурлев В.А. и др. 2019; Taguchi et al., 2016; Matalliotakis et al., 2018].

Представляется более важным комплексное изучение процессов, отражающих не только выраженный дисбаланс – оксидативный стресс, но и изменения, происходящие во взаимоотношениях оксиданты-антиоксиданты, реализующих модуляцию сигнальных путей и эпигенетических механизмов [Czyzyk et al., 2017; Asghari et al., 2018; Koninckx et al., 2019]. При данном подходе значимыми становятся любые изменения в свободно-радикальной системе как в сторону повышения прооксидантов, так и в сторону антиоксидантов, так как запускают целый каскад событий с участием цитокинов и факторов роста [Проскурнина Е.В.,

2018]. В некоторых ситуациях эти процессы становятся виновниками формирования «порочных кругов» и накопления мутаций в клетке, что в конечном итоге может приводить к развитию злокачественных процессов [Yamaguchi et al., 2008; Iwabuchi et al., 2015].

Данные нарушения можно обозначить как свободно-радикальный дисбаланс, и этот подход дал нам новое понимание процессов, происходящих в жизнедеятельности организма в физиологических условиях и при развитии патологии. Этот принцип применим для изучения роли в развитии бесплодия изменений оксидантно-антиоксидантного статуса у пациенток с НГЭ. В данной работе нами рассмотрены свободно-радикальные процессы, происходящие как на системном уровне (в плазме крови), так и на локальном: в перитонеальной жидкости, в эндометриальной кисте и ее окружении, в фолликулярной жидкости. Эти знания могут в дальнейшем быть использованы для диагностики малых форм НГЭ и определения тактики ведения пациенток в зависимости от параметров свободно-радикального гомеостаза.

Степень разработанности темы исследования

Разработка наиболее эффективных методов диагностики причин женского бесплодия занимает одно из ведущих мест в современной гинекологии. Одной из причин женского бесплодия является НГЭ с «бессимптомным» течением, единственным проявлением которого является бесплодие [Адамян и др., 2017; Šalamun et al., 2018; Rehmer et al., 2019]. Нередко пациенток с нормальным уровнем гормонов, отсутствием патологии со стороны органов малого таза по данным трансвагинальной эхографии и с нормозооспермией у партнера относят в группу бесплодия неясного генеза, и вопрос о необходимости проведения им диагностической лапароскопии для исключения эндометриоза вызывает много дискуссий. На сегодняшний день измерение уровня про- и антиоксидантов для выявления НГЭ не представляется возможным в связи с отсутствием соответствующих тест-систем, а существующие подходы основаны на маркерном уровне, основным недостатком которого является нестабильность маркеров и их превращение в метаболиты в процессе отбора и хранения пробы. В связи с этим возможно использование для диагностики НГЭ провоспалительных цитокинов, тесно связанных с АФК [Подзолкова Н.М. и др., 2018; Соколова Е.И. и др., 2019; Nisenblat et al., 2016; Jiang et al., 2019].

В литературе широко обсуждается роль лапароскопии в преодолении эндометриоз-ассоциированного бесплодия [Дубинская Е.Д. и др., 2018; Кузьмина Н.С. и др., 2018;

Гаспаров А.С. и др, 2019; Давыдов А.И и др., 2019; Alio et al., 2019; Park et al., 2019]. Целесообразность и эффективность оперативного лечения пациенток с бесплодием и НГЭ рассматривается как правило в исследованиях «случай-контроль», а выводы делаются по результатам проведенных мета-анализов. Однако исследования такого рода не отвечают на вопрос: каким же образом происходит восстановление естественной фертильности после проведенной лапароскопии? Мы предполагаем, что важное значение в этом может иметь восстановление свободно-радикального гомеостаза в брюшной полости и особенно в полости малого таза.

В проблеме эндометриоз-ассоциированного бесплодия немаловажную роль также играет и снижение овариального резерва у пациенток с эндометриоидными кистами яичников. Характер патофизиологических изменений в ткани яичника под воздействием эндометриоидной кисты изучен недостаточно. При этом оптимальный подход к лечению эндометриоидных кист яичника в настоящее время остается предметом активной научной дискуссии, поскольку существует множество подтверждений того, что хирургическое удаление кисты крайне негативно сказывается на овариальном резерве и, как следствие, на репродуктивном потенциале яичника [Назаренко Т.А., 2013; Дубинская Е.Д. и др., 2017; Филиппова Е.С. и др., 2017; Somigliana, 2018]. Возможное токсическое влияние эндометриоидной кисты на окружающую здоровую ткань яичника изучено очень мало и не рассматривается врачом при принятии решения о проведении операции или выборе выжидательной тактики. С другой стороны, в литературе приводятся данные, подтверждающие повреждение яичника ещё до оперативного вмешательства [Дубинская Е.Д. и др., 2017; Парамонова Н.Б. и др, 2018; Давыдов А.И. и др., 2019; Kitajima et al., 2018]. Немаловажную роль в этом могут играть свободные радикалы.

У ряда пациенток с НГЭ единственным вариантом достижения беременности является применение ВРТ. В литературе приводятся данные о повышенной частоте неудач ЭКО у больных эндометриозом [Кузьмина Н.С. и др., 2017; Назаренко Т.А. и др., 2019; Barbosa et al., 2014; Hamdan et al., 2015]. Отсутствие понимания физиологических механизмов, происходящих при созревании ооцита и во многом определяющих его последующую способность к оплодотворению, делает труднообъяснимым снижение частоты наступления беременности в цикле ЭКО у пациенток с НГЭ. В последние годы увеличилось количество

работ, посвященных связи качества эмбрионов с показателями оксидативного стресса в фолликулярной жидкости [Шестакова М.А. и др., 2017; Nishihara et al., 2018]. Однако исследования, описывающие свободно-радикальный гомеостаз фолликулярной жидкости в зависимости от наличия эндометриоза и схемы стимуляции суперовуляции, немногочисленны [Celik et al., 2012; Mathyk et al., 2018]. Нами была предпринята попытка определения факторов, воздействие которых может изменять оксидантно-антиоксидантный профиль фолликулярной жидкости.

Таким образом, все вышеизложенное обусловило формулировку цели и постановку задач исследования.

Цель исследования

Создать современную концепцию восстановления репродуктивной функции пациенток с наружным генитальным эндометриозом с учетом степени его тяжести на основании изучения патогенеза нарушений оксидантно-антиоксидантного баланса и выявления факторов, влияющих на фертильность.

Задачи исследования

1. Изучить значение нарушений локального (перитонеальная жидкость) и системного (плазма крови) антиоксидантного профиля в патогенезе различных стадий наружного генитального эндометриоза.
2. Уточнить значимость изменений антиоксидантного профиля в перитонеальной жидкости и плазме крови при бесплодии, обусловленном наружным генитальным эндометриозом.
3. Определить источники активных форм кислорода в стенке и содержимом эндометриоидной кисты различных размеров и выявить механизмы антиоксидантной защиты в прилежащей к кисте ткани яичника.
4. Изучить наличие и частоту оксидативного стресса в фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием, обусловленным наружным генитальным эндометриозом, проходящих лечение в программе ЭКО.
5. Дать научное обоснование применяемым схемам стимуляции суперовуляции и используемым анестетикам в программе ЭКО при эндометриоз-ассоциированном

бесплодии с учетом показателей оксидантно-антиоксидантного профиля фолликулярной жидкости.

6. Оценить эффективность восстановления естественной фертильности после хирургической коагуляции поверхностных очагов эндометриоза на тазовой брюшине, иссечения глубоких эндометриоидных имплантов и удаления эндометриоидных кист яичников в отсутствие прегравидарной подготовки и при ее проведении.
7. На основании определения исходного локального антиоксидантного профиля (перитонеальная жидкость) выявить частоту наступления беременности после хирургической коагуляции поверхностных очагов эндометриоза на тазовой брюшине, иссечения глубоких эндометриоидных имплантов и удаления эндометриоидных кист яичников.

Научная новизна

Проведено изучение механизмов, приводящих к бесплодию у пациенток с НГЭ с позиций, отражающих не только оксидативный стресс, но и изменения, происходящие во взаимоотношениях оксиданты-антиоксиданты без повреждения и реализующих модуляцию сигнальных путей и эпигенетических механизмов. Свободно-радикальные процессы, происходящие при НГЭ и приводящие к развитию бесплодия, были рассмотрены как на системном уровне (в плазме крови), так и на локальном: в перитонеальной жидкости, в эндометриоидной кисте и ее окружении, в фолликулярной жидкости. Был применен новый подход выявления оксидантно-антиоксидантных взаимоотношений, основанный не на изучении отдельных маркеров повреждения оксидативным стрессом ДНК, белков и липидов, а на исследовании обширной совокупности реакций с участием свободных радикалов, описываемых кривыми хемилюминесценции.

Изучение антиоксидантного профиля (а не отдельных показателей) перитонеальной жидкости показало, что при распространенных формах НГЭ наблюдалось повышение параметров антиоксидантной защиты. Изменение локального антиоксидантного профиля в сторону активации антиоксидантной защиты, по-видимому, носили компенсаторный характер, вследствие повышенной выработки прооксидантов. Полученные данные позволили обосновать роль свободно-радикальных нарушений в распространении (или прогрессировании) НГЭ: эффективная антиоксидантная функция могла замедлить гибель

клеток эктопического эндометрия и привести к формированию «порочного круга»: большее количество эндометриоидных имплантов продуцировало большее количество АФК, что вызывало активацию антиоксидантной защиты и «выживаемость» клеток под действием сублетальных концентраций АФК.

Впервые в России с позиций свободно-радикального дисбаланса, играющего ключевую роль в патогенезе эндометриоз-ассоциированного бесплодия, была обоснована эффективность хирургического лечения эндометриоза. Было показано, что у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием наблюдаются изменения редокс-статуса как в сторону снижения антиоксидантной защиты в плазме крови и перитонеальной жидкости, так и повышения уровня антиоксидантов (**патент № 2599019**). При этом беременность после проведенной лапароскопии чаще наступала у пациенток с исходно измененным антиоксидантным профилем (как в сторону снижения антиоксидантов, так и их повышения). При этом у пациенток, у которых беременность не наступила, исходно показатели антиоксидантной активности были в пределах референтных значений.

К развитию бесплодия приводили и свободно-радикальные изменения в фолликулярной жидкости. При этом применение во время ЭКО схем стимуляции суперовуляции с агонистами гонадотропин релизинг-гормона усугубляло оксидативный стресс в микроокружении ооцита, что объясняет относительно большую эффективность коротких протоколов у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием. Было показано увеличение антиоксидантной емкости фолликулярной жидкости при использовании севофлурана за счет эффекта прекондиционирования.

Была проведена комплексная оценка оксидантно-антиоксидантных взаимоотношений в яичнике, содержащем эндометриоидную кисту: изучен прооксидантный профиль содержимого эндометриоидной кисты, изменения антиоксидантного статуса стенки эндометриоидной кисты и тканей, прилежащих к ней. Было установлено, что содержимое кисты является сильным прооксидантом (на порядок сильнее гемоглобина), способным инициировать свободно-радикальный дисбаланс в микроокружении эндометриоидной кисты. Для устранения редокс-дисбаланса в эктопических эндометриальных клетках стенки эндометриоидной кисты, которые подвергались атаке АФК, происходит увеличение «запаса» НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы в стенке эндометриоидной кисты, однако ее

активность остается недостаточной для нейтрализации свободных радикалов. Истощение резервов антиоксидантной защиты, по-видимому, приводит к проникновению АФК через стенку эндометриоидной кисты и атаке здоровой ткани яичника, тем самым запуская цитохром С-активированную гибель митохондрий в микроокружении эндометриоидной кисты яичника, вызывающую апоптоз и возникновение фиброза, и, как следствие, снижение овариального резерва.

Повышению рецептивности эндометрия, а, следовательно, эффективности восстановления репродуктивной функции, способствовала комплексная прегравидарная подготовка, проводимая по индивидуально подобранным схемам (**патент (№2597845)**).

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложен алгоритм ведения пациенток с бесплодием, обусловленным НГЭ. Была выявлена недостаточность критериев, на основании которых обычно проводится предоперационная верификация НГЭ: установлено, что распространенность НГЭ превышала прогнозируемый до операции уровень более чем в 2 раза. Доказана нецелесообразность применения неинвазивных методов диагностики оценки проходимости маточных труб (гистеросальпингография и эхогидросонография) у пациенток с бесплодием в связи с низкой специфичностью данных методик и невозможностью выявления НГЭ как ведущей причины первичного бесплодия. Для диагностики малых форм эндометриоза было предложено совместное исследование уровней цитокина ИЛ-6 и онкомаркера СА-125, которое позволило верифицировать НГЭ I-II стадий с чувствительностью 93% и специфичностью 88%.

На основании данных клинического обследования, сохранности овариального резерва уточнены факторы, способствующие наступлению самопроизвольной и индуцированной беременности у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием. Было установлено, что шанс наступления самопроизвольной беременности снижался при возрасте женщин более 32 лет, с длительностью инфертильности более 3 лет, с двусторонней локализацией эндометриоидных кист, при удалении эндометриоидных кист более 6 см, при сниженных показателях овариального резерва по данным УЗИ и гормонального исследования, при нарушениях внутриматочной перфузии. Было показано, что прогностически благоприятным ультразвуковым критерием наступления самопроизвольной беременности после удаления эндометриоидных кист является наличие доминантного фолликула и количество антральных

фолликулов более 5. Важное значение для прогнозирования наступления беременности имеет определение интенсивности внутриматочного кровотока. На основании определения показателей гормонального профиля определены критерии наступления беременности: практически невозможно наступление самопроизвольной беременности при уровнях ФСГ более 12 МЕ/мл и АМГ менее 0,5 нг/мл. Шанс наступления самопроизвольной беременности повышается при АМГ более 2нг/мл, прогностические сложности наблюдались в диапазоне АМГ 0,9-1,2 нг/мл.

Наступлению самопроизвольной беременности после оперативного лечения по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия способствовали тщательная коагуляция и иссечение всех эндометриодных гетеротопий и бережная энуклеация эндометриодных кист в сочетании с проведением прегравидарной подготовки. Частота самопроизвольного наступления беременности после лапароскопической операции и проведения прегравидарной подготовки увеличилась в 1,7 раза: с 30,6% у пациенток в отсутствие гормональной и вазоактивной терапии до 53,6% - при применении прегравидарной подготовки.

В работе были уточнены критерии для проведения ВРТ у пациенток с НГЭ: наибольшая частота наступления беременности наблюдалась у пациенток с I-II стадиями эндометриоза с длительностью бесплодия менее 3 лет и при пункции более 8 ооцитов. Уменьшение эффективности ЭКО выявлено при сниженных показателях овариального резерва по данным УЗИ и гормонального исследования, сопровождающихся более бедным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции. Частота наступления клинической беременности при ЭКО по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия составила 40,4%. При этом повышение эффективности ЭКО возможно при использовании коротких схем стимуляции суперовуляции с антагонистами гонадотропин релизинг-гормона использовании в качестве препарата для анестезии севофлурана и переносе витрифицированных ооцитов.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку эффективности хирургических и консервативных мероприятий, а также применение программ ЭКО в восстановлении и реализации репродуктивной функции пациенток с наружным генитальным эндометриозом и оценку значимости нарушений оксидантно-антиоксидантного баланса в патогенезе НГЭ.

Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины. Произведен отбор больных и статистическая обработка результатов. Проведена оценка отдаленных результатов лечения с использованием инструментальных методов исследования и анкетирования.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Комбинированное исследование уровней ИЛ-6 и СА-125 позволяет повысить качество неинвазивной диагностики ранних стадий НГЭ. Скрининг-методы оценки проходимости маточных труб (гистеросальпингография, эхогидросальпингография) у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием не показаны в силу низкой информативности.

2. Наступлению беременности при НГЭ препятствует как недостаток, так и избыток антиоксидантов на системном и локальном уровнях. Повышение уровня антиоксидантов в перитонеальной жидкости имеет важное значение в прогрессировании эндометриоза.

3. Ключевую роль в снижении овариального резерва при эндометриоидных кистах играет их содержимое, являющееся источником свободных радикалов, нейтрализация которых происходит, в том числе за счет активации НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы. При исчерпании резервов антиоксидантной защиты в микроокружении эндометриоидной кисты яичника запускаются механизмы, приводящие к снижению овариального резерва.

4. Частота наступления беременности у пациенток с НГЭ не зависит от степени распространенности патологического процесса при адекватно проведенном хирургическом лечении и назначении прегравидарной подготовки.

5. Факторами, неблагоприятно влияющими на фертильность у пациенток с НГЭ, являются возраст более 32 лет, длительность инфертильности более 3 лет, двусторонняя локализация эндометриоидных кист, удаление эндометриоидных кист более 6 см, сниженные показатели овариального резерва. Проведение прегравидарной подготовки у таких пациенток позволяет повысить частоту наступления беременности в 1,7 раза.

6. Свободно-радикальные изменения в микроокружении ооцита, главным образом в белковом звене, приводят к развитию бесплодия. Применение схем стимуляции

суперовуляции с агонистами гонадотропин релизинг-гормона усугубляет оксидативный стресс в фолликулярной жидкости. Использование севофлурана повышает антиоксидантную емкость фолликулярной жидкости за счет эффекта прекондиционирования.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность данных исследования подтверждается достаточным количеством пациенток, включенных в исследование, используемыми методами исследования, соответствующим цели и задачам исследования. Статистическая обработка данных проводилась с помощью методов параметрической и непараметрической статистики. Проверка нормальности распределения осуществлялась согласно расчету критерия Шапиро-Уилка. Для статистически значимого определения достоверности различий в двух независимых выборках рассчитывался t-критерий Стьюдента при нормальном распределении и U-тест Манн-Уитни при распределении, отличном от нормального. Для оценки различий качественных признаков рассчитывался критерий χ^2 . При малых объемах выборок пациенток вычислялся точный критерий Фишера. Определение порогового значения количественных данных проводилось с помощью построения ROC-кривых. При этом принимали во внимание, что если площадь под ROC-кривой составляла 0,9-1,0, то диагностическая ценность признака была очень высокой, если площадь была равна 0,5-0,6, то неудовлетворительной. Определение диагностической значимости инструментальных и лабораторных методов исследования проводилось путем вычисления их чувствительности и специфичности, а также критериев правдоподобия. Для определения прогностически значимых критериев вычислялось отношение шансов (ОШ), достоверными принимались значения, если границы 95% доверительный интервал (ДИ) не содержали 1,0. В качестве критического уровня значимости был принят $p < 0,05$ (доверительный интервал 95%). Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Апробация диссертации

Основные положения научно-исследовательской работы доложены и обсуждены на: 1-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (4-6 декабря 2013, Москва), XI Всемирном конгрессе перинатальной медицины (19-23 июня 2013, Москва), 24-м ежегодном конгрессе Европейского общества гинекологической эндоскопии (7-10 октября 2015,

Будапешт, Венгрия), XI Международном конгрессе по репродуктивной медицине (17-20 января 2017, Москва), 8-й Международной конференции «Перинатальная медицина: новые технологии и междисциплинарные подходы» (13-14 октября 2017, Екатеринбург), конференции с мастер-классом «Продвинутая междисциплинарная лапароскопическая хирургия» (23-24 октября 2017, Москва), научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (15-16 мая 2018 Гродно, Беларусь), XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (16-19 января 2018, Москва), XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (21-24 января 2019, Москва), Первом национальном конгрессе с международным участием ЛАБРИН (22-23 апреля 2019, Москва), XXXII Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (4-7 июня 2019).

Апробация диссертации состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России и врачей ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции» Департамента здравоохранения г. Москвы от 18.12.2019 протокол №3.

Личный вклад автора

Идея диссертационной работы и ее реализация принадлежит автору, а именно: углубленный анализ отечественной и зарубежной литературы, планирование научной работы, разработка подходов, доказательство взаимосвязей, сбор клинического материала (самостоятельное выполнение и ассистенция на эндоскопических операциях, ведение пациенток в пред-, послеоперационном периоде, на этапе планирования беременности), анализ и интерпретация клинических, лабораторных и инструментальных данных, их систематизация, статическая обработка и описание полученных данных, написание и оформление основных публикаций по теме диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4, 5 паспорта акушерство и гинекология.

Реализация и внедрение полученных результатов в практику

Разработанные и усовершенствованные алгоритмы к ведению пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием внедрены в работу гинекологического и консультативно-диагностического отделений ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции» Департамента здравоохранения г. Москвы и «Медицинский научно-образовательный центр» Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Результаты работы используются в процессе обучения студентов 4-6 курсов, ординаторов и аспирантов факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 работы, из них 10 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 3 – в Scopus, 9 тезисов докладов на международных и российских конференциях, а также в 2 патентах на изобретение, зарегистрированных в Госреестре РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 299 страницах печатного текста, построена в монографическом стиле, состоит из введения, 6 глав собственных результатов, каждая из которых является самостоятельным законченным исследованием, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 392 источника, из них отечественных 111 и зарубежных 281. Иллюстративный материал представлен 38 таблицами и 64 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных нами задач были использованы две категории наблюдений: клинические и патофизиологические. Клиническая часть работы основана на результатах анализа обследования и лечения пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием. Всего в исследование было включено 897 пациенток, из них 743 с НГЭ (I-II стадия – 463 пациентки, III-IV стадия – 280 пациенток). Группы сравнения составили пациентки с трубно-перитонеальным бесплодием (ТПБ) – 118, с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) – 36. В исследование были включены пациентки, наблюдавшиеся в Центре планирования семьи и репродукции Департамента Здравоохранения г. Москвы (главный врач – к.м.н. О.А. Латышкевич) и Медицинском научно-образовательном центре МГУ имени М.В.Ломоносова

(директор – академик А.А. Камалов), также в исследовании приняли участие 20 пациенток, проходивших лечение методом ЭКО в клинике «Москворечье» (руководитель – профессор А.А. Попов).

У всех пациенток было получено информированное согласие на обработку персональных данных, а также использование биологического материала.

Оперативная лапароскопия была произведена после детального обследования, включавшего в себя выяснение жалоб, сбор соматического, акушерского и гинекологического анамнеза, объективный и гинекологический осмотр, определение гормонального профиля, выполнение тестов функциональной диагностики, проведение УЗИ органов малого таза, а также выполнение некоторых дополнительных лабораторных и инструментальных методов диагностики, в зависимости от предполагаемой у пациентки патологии. Ультразвуковое исследование проводили на аппаратах экспертного класса Siemens Antares и Voluson V8. Всем пациенткам трансвагинальная эхография проводилась на 5-7 день менструального цикла, изучение внутриматочное перфузии выполнялось на 5-8 день после овуляции (в период «окна имплантации») с последовательной доплерометрией маточных, радиальных, базальных и спиральных артерий. Оценка овариального резерва включала определение уровней АМГ, ФСГ, ингибина В, а также ультразвуковые параметры (объем яичника, количество антральных фолликулов, наличие доминантного фолликула). Сниженным считали овариальный резерв на основании предикторов, разработанных Назаренко Т.А. и Краснопольской К.В. (2013).

Лапароскопия выполнялась при помощи комплекта эндоскопического оборудования и инструментов «KARL STORZ®». Оценка проходимости маточных труб осуществлялась во время лапароскопии при помощи установленной в цервикальный канал маточной канюли Cohen и введения контрастного вещества с одномоментным визуальным контролем. В послеоперационном периоде всем пациенткам выполнялись обезболивание и антибактериальная терапия по показаниям. Во время лапароскопии у пациенток с эндометриоидными кистами яичников была проведена энуклеация кисты в пределах здоровой ткани. Аквадиссекция позволяла облегчить отделения стенки кисты от неизменной ткани яичника, что приводило к уменьшению повреждения овариального резерва вследствие точечной коагуляции мелких кровотокающих сосудов, гемостаз выполнялся с помощью

биполярной энергии. При спаечном процессе в малом тазу одновременно производился лизис спаек. Поверхностные очаги эндометриоза коагулировались при помощи биполярной коагуляции, при этом для выявления «немых» очагов при малых формах эндометриоза проводилась термопроба браншами биполярных щипцов. При наличии инфильтративного поражения тазовой брюшины производилось иссечение очагов эндометриоза с помощью ножниц. При локализации эндометриоидных гетеротопий в проекции мочеточника, проводилась его диссекция на протяжении. При глубоком эндометриозе ретровагинального пространства проводилось иссечение эндометриоидного инфильтрата с мобилизацией прямой кишки, а при прорастании очагов эндометриоза в серозную оболочку прямой кишки производился «шейвинг».

Оптимизация неинвазивной диагностики НГЭ была выполнена у 90 пациенток, на основании определения уровней СА-125, СА-19.9, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и ИЛ-8 методом иммуноферментного анализа. Для изучения ценности этих маркеров в диагностике НГЭ пациентки были разделены на две группы: 64 пациентки были включены в группу с НГЭ и 26 пациенток составили контрольную группу. В контрольную группу вошли пациентки с ТПБ и верифицированным отсутствием эндометриоза по данным лапароскопии.

Предикторы самопроизвольного наступления беременности устанавливались на основании изучения данных клинико-лабораторного обследования 154 пациенток. 56 пациенткам после проведения оперативной лапароскопии назначалась прегравидарная подготовка. Целью терапии было снижение уровня эстрогенов и нормализация гормонального фона, развитие сосудистой сети эндометрия и миометрия, улучшение кровотока в системе маточной артерии от магистральных сосудов до конечных артериол, нормализации показателей коагулограммы. Терапия была комплексной и включала несколько компонентов.

1 – у пациенток с распространенным эндометриозом с целью снижения уровня эстрогенов назначался диеногест 2 мг в сутки в непрерывном режиме, срок терапии составлял 4-6 месяцев.

2 – всем пациенткам, с целью коррекции недостаточности лютеиновой фазы были назначены прогестагены в лютеиновую фазу менструального цикла (микронизированный прогестерон 200 мг в сутки или дидрогестерон 10 мг x 2 раза в сутки). Также прегравидарная

терапия была дополнена назначением витаминов: омега 3 по 1 капсуле в сутки, убидекаренон 40 капель в день, фолиевая кислота в суточной дозировке - 400 мг в сутки.

3 - повторное обследование проводилось через два-три месяца неэффективных попыток зачатия и заключалось в исследовании показателей спермограммы партнера, повторной оценке гормонального профиля и показателей овариального резерва, развернутой гемостазиограммы, выполнении УЗИ органов малого таза (в том числе с проведением доплерометрии маточных сосудов).

4 - при нарушениях внутриматочной перфузии (наличии «аваскулярных» зон, дефиците кровоснабжения отдельных локусов миометрия, отсутствии визуализации спиральных артерий в эндометрии), а также при повышении свертываемости крови в комплексной вазоактивной терапии назначались низкомолекулярные гепарины (НМГ) - эноксапарин натрия (0,4 мл однократно в сутки) или надропарин кальция (в разовой дозе 0,3 мл в день) в течение 7–10 дней в лютеиновой фазе менструального цикла с прекращением лечения на период менструации. Терапия продолжалась в течение 1-2 менструальных циклов.

Прегравидарная подготовка по вышеизложенной схеме продолжалось до момента зачатия в течение 4-6 месяцев, и далее после зачатия, дозировки препаратов подбирались индивидуально.

При отсутствии наступления беременности в течение одного года после лапароскопии пациенткам была рекомендована консультация репродуктолога. ЭКО было выполнено 72 пациенткам с эндометриоз-ассоциированным бесплодием.

Исходы беременности были изучены у 200 пациенток с НГЭ. Из них 110 пациенток были прооперированы в рамках настоящего исследования по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия, у 90 пациенток беременность наступила на фоне эндометриоидных кист (эту группу составили пациентки, родоразрешенные в ЦПСиР).

Патофизиологические исследования проводились на кафедре медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (декан – академик В.А. Ткачук). Всего был изучен 281 образец, исследование включало определение антиоксидантного профиля образцов плазмы, перитонеальной жидкости и фолликулярной жидкости; изучение редокс-статуса эндометриоидной кисты (содержимого эндометриоидной кисты, стенки эндометриоидной кисты и ткани, окружающей эндометриоидную кисту). Забор

крови осуществлялся до проведения любых хирургических вмешательств. Перитонеальную жидкость аспирировали из дугласова пространства во время лапароскопии сразу после введения дополнительных троакаров до проведения хирургических манипуляций. Фолликулярную жидкость получали из доминантного фолликула у пациенток, проходивших лечение в программе ЭКО. Объем образцом составлял 1,0 мл. Исследование редокс-баланса плазмы крови, перитонеальной жидкости, фолликулярной жидкости проводили методом активированной хемилюминесценции [Проскурнина Е.В., 2018].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были сопоставлены пред- и послеоперационные диагнозы у пациенток с бесплодием. Установлено, что частота НГЭ как причины бесплодия была недооценена на предоперационном этапе и что реальная распространенность НГЭ превышала выявленный до операции эндометриоз более чем в 2 раза. Диагноз НГЭ верно до операции был верифицирован только у 34 (44,2%) пациенток, тогда как 43 (55,8%) пациентки были направлены на лапароскопию по поводу ТПБ. Нами были проанализированы критерии, на основании которых проводилась предоперационная верификация диагноза. Основным анамнестическим симптомом для установления хронического сальпингоофорита и тесно связанного с ним ТПБ, являлись хронические тазовые боли, связанные с менструальным циклом хотя известно, что наиболее частой причиной болевого синдрома в малом тазу у пациенток молодого возраста является НГЭ [Радзинский В.Е. и др., 2019]. Кроме того, до операции диагноз ТПБ был верифицирован на основании выявления непроходимости маточных труб по данным неинвазивных методов (гистеросальпингография и эхогидросонография). Проведенный статистический анализ установил, что чувствительность гистеросальпингографии составила 100%, а специфичность – 22,4%; чувствительность эхогидросонографии была 100%, специфичность – 38,9%. То есть данные методики оценки проходимости маточных труб имеют большое количество ложноположительных результатов и мы считаем, что пациенткам с подозрением на эндометриоз нужно начинать обследование сразу с лапароскопии, без предварительной оценки проходимости маточных труб.

Эти результаты определили следующую задачу исследования: оптимизацию неинвазивной диагностики малых форм НГЭ. Известно, что возможности диагностики

данного заболевания во многом определяются степенью его распространенности. Не вызывает особых сложностей диагностика тяжелых форм эндометриоза, эндометриoidных кист, выявление которых возможно и клиническими, и инструментальными (трансвагинальная эхография, магнитно-резонансная томография) методами исследования. При этом диагностика малых форм эндометриоза представляет существенные трудности. Одним из маркеров НГЭ нами было выбрано исследование онкомаркеров СА-125 и СА-19.9, определение которых широко распространено в клинической практике (таблица 1).

Таблица 1 - Концентрации цитокинов и онкогенов в зависимости от степени тяжести эндометриоза

Предиктор	Контрольная группа (n=26)	I-II стадии НГЭ (n=28)	III-IV стадии НГЭ (n=36)
СА-125, ед/мл	7,0 (5,9-9,9)	11,7 (6,1-16,4)	19,4 (16,0-90,1)**
СА-19.9, ед/мл	8,0 (16,2-11,4)	9,9 (8,7-14,2)	12,1 (8,9-16,8)*
ИЛ-6, пг/мл	1,5 (0,9-2,1)	4,6 (1,7-5,4)*	16,2 (11,8-21,8)***
ИЛ-8, пг/мл	5,8 (3,5-15,4)	11,2 (3,5-15,6)*	31,1 (25,0-44,7)**

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; *** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой. Непонятно, что Вы с чем сравниваете

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, при НГЭ онкомаркеры СА-125 и СА-19.9 достоверно повышены при тяжелых формах эндометриоза по сравнению с группой контроля, однако значимых различий у пациенток с НГЭ I-II стадий и его отсутствием (контрольная группа) выявлено не было. При I-II стадиях эндометриоза наблюдается повышение провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 по сравнению с контролем. Под влиянием провоспалительных цитокинов резко увеличивается образование макрофагами и нейтрофилами перекиси водорода и других свободных радикалов. Избыточная продукция свободных радикалов приводит к оксидативному стрессу, через который реализуются апоптотические механизмы в яичниках и эндометрии.

Для выявления порогового уровня концентраций ИЛ-6, ИЛ-8, СА-125 и СА19.9, при котором увеличивается вероятность развития эндометриоза, нами был проведен анализ с построением ROC-кривых. По данным ROC-анализа повышение ИЛ-6 более 2,6 пг/мл позволяет выявить НГЭ I-II стадий с чувствительностью 68% и специфичностью 88%. Диагностическая значимость СА-125 в выявлении малых форм эндометриоза составляет 54% (чувствительность) и 81% (специфичность). При повышении СА-19.9 возможно выявление

НГЭ с чувствительностью 62% и специфичностью – 56%. Таким образом, оценка результатов исследования ИЛ-6, ИЛ-8, СА-125 и СА-19.9 при НГЭ I-II стадий показала, что ни один из рассматриваемых показателей не обладает достаточной диагностической ценностью. В связи с этим мы провели комбинированное исследование ИЛ-6, ИЛ-8, СА-125, СА-19.9 путем логистического регрессионного анализа (таблица 2).

Таблица 2 - Прогнозирование I-II стадий эндометриоза при комбинированном исследовании уровней онкомаркеров и цитокинов

	AUC (95% ДИ)	Чувствительность, %	Специфичность, %
СА-125 и цитокины			
ИЛ-6	0,92 (0,75-0,96)	93	88
ИЛ-8	0,54 (0,40-0,71)	54	54
СА-19.9 и цитокины			
ИЛ-6	0,85 (0,72-0,93)	84	65
ИЛ-8	0,67 (0,53-0,79)	73	56

Примечание: AUC - площадь под ROC- кривой. 95% ДИ - 95% доверительный интервал

Как следует из данных, представленных в таблице 2, повышение уровней ИЛ-6 и СА-125 выше пороговых значений с высокой чувствительностью (93%) и специфичностью (88%) позволяет выявить максимальное количество пациенток с эндометриозом I-II стадий.

Основным критерием оценки эффективности оперативного лечения пациенток с НГЭ ($n=77$), служило наступление беременности. Дополнительно учитывались данные анамнеза, состояние овариального резерва яичников, степень выраженности заболевания, выявленная при лапароскопии сопутствующая патология, наступление беременности без применения ВРТ. Группу сравнения составили пациентки с ТПБ ($n = 66$). Было установлено, что частота наступления беременности составила у пациенток с НГЭ 44,1% (из них самопроизвольно беременность наступила у 31,1%), при ТПБ – 39,4% (из них самопроизвольно - у 25,7%). Достоверных различий в частоте наступления беременности между группами выявлено не было. При этом не было выявлено существенных различий и в наступлении беременности у пациенток с различными стадиями НГЭ: у пациенток с НГЭ I-II степени ($n=59$) частота наступления беременности после лапароскопии составила 42,4% (самопроизвольно - у 30,5% пациенток); при III-IV степени ($n=18$) распространенности эндометриоза эффективность

лечения бесплодия составила 38,9% (самопроизвольное наступление беременности – 22,2%). Данные литературы [Carneiro M.M., 2017; Daraï E., 2017; Daniilidis A., 2018] в отношении частоты наступления беременности при глубоком инфильтративном эндометриозе противоречивы однако наши результаты показали, что иссечение инфильтративных эндометриоидных гетеротопий не только способствует уменьшению болевого синдрома, но и увеличивает шанс наступления беременности.

Важным итогом клинического этапа работы явилось выявление факторов, влияющих на наступление самопроизвольной беременности у пациенток с НГЭ. Отношение шансов самопроизвольного наступления беременности было рассчитано у 154 пациенток с НГЭ (таблица 3).

Таблица 3 - Факторы, влияющие на восстановление естественной фертильности после проведенного хирургического лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия

Факторы	Отношение шансов	95 % ДИ	p
Возраст более 32 лет	0,39	0,15-0,61	p<0,05
Первичное бесплодие	0,85	0,42-1,70	p>0,05
Роды в анамнезе	1,71	0,71-4,10	p>0,05
Длительность бесплодия более 3 лет	0,49	0,26-0,98	p<0,05
НГЭ III-IV стадии	1,07	0,53-2,13	p>0,05
Эндометриоидные кисты яичников (одно- или двусторонние)	1,15	0,60-2,22	p>0,05
Двусторонние эндометриоидные кисты яичников	0,30	0,09-0,94	p<0,05
Размер эндометриоидных кист более 6 см	0,38	0,16-0,96	p<0,05
Наличие ретроцервикального эндометриоза	0,65	0,30-1,42	p>0,05
Иссечение эндометриоидных гетеротопий	0,92	0,47-1,83	p>0,05
Уровень АМГ $\leq 0,6$ нг/мл	0,04	0,006-0,34	p<0,05
Уровень ингибина В ≤ 20 пг/мл	0,07	0,017-0,32	p<0,05
Уровень ФСГ ≥ 12 МЕ/мл	0,08	0,02-0,37	p<0,05
Число фолликулов ≤ 5	0,38	0,17-0,82	p<0,05
Отсутствие доминантного фолликула	0,16	0,08-0,34	p<0,05
Нарушение внутриматочной перфузии	0,15	0,07-0,32	p<0,05

Примечание: 95% ДИ - 95% доверительный интервал

Было установлено, что шанс наступления беременности снижается при возрасте женщин более 32 лет, с длительностью infertility более 3 лет, с двусторонней локализацией эндометриоидных кист, при удалении эндометриоидных кист более 6 см, при

сниженных показателях овариального резерва по данным УЗИ и гормонального исследования, при наличии нарушений внутриматочной перфузии.

Впервые для пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием нами было предложено назначение прегравидарной подготовки (ПП). Основанием для назначения гормональных и вазоактивных препаратов при бесплодии явились данные литературы относительно снижения рецептивности эндометрия при эндометриозе и недостаточности секреторной фазы эндометрия. Для определения роли ПП в наступлении беременности было проведено разделение пациенток на две группы: в первой группе пациенткам проводилась ПП (n=56), во второй ПП отсутствовала (n=98). Различий в возрасте, акушерском и гинекологическом анамнезе, распространенности НГЭ у пациенток с наличием и отсутствием ПП выявлено не было. Нами были получены значимые различия в частоте наступления беременности в двух группах пациенток: самопроизвольно беременность наступила у 53,6% пациенток, получавших ПП, и у 30,6% – без проведения ПП.

Основу прегравидарной подготовки составляли препараты прогестерона. Наиболее эффективными оказались схемы ПП, включавшие комбинацию гестагенов и НМГ, такая комбинация привела к увеличению наступления беременности в 1,8 раза по сравнению с пациентками, которые не получали НМГ ($p < 0,05$). Ранее эффективность НМГ была доказана для улучшения имплантационных способностей у пациенток с привычным невынашиванием и поздними акушерскими осложнениями (Бугеренко Е.Ю., 2012; Ларина Е.Б. и др., 2017; Озолия Л.А. и Овсепян Н.Р., 2019). В настоящее время не подвергается сомнению, что плацентация и дальнейшее развитие плодного яйца невозможны без активного кровоснабжения эндометрия и подлежащего миометрия в зоне имплантации. Нормализуя кровоток в маточных артериях, НМГ способствуют формированию достаточной для имплантации толщины эндометрия, а также оказывают благоприятное влияние на рецептивность эндометрия. НМГ способствуют дифференцировке и инвазии клеток трофобласта, эндотелиальному ангиогенезу, уменьшают апоптоз в эндометрии, вызванный оксидативным стрессом, и снижают сосудистое сопротивление.

Полученные клинические данные о высокой частоте наступления беременностей после лапароскопии даже по поводу тяжелых форм эндометриоза определили необходимость изучения причин, приводящих к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия. Мы

посчитали, что установление звеньев патогенеза НГЭ позволит объяснить эффективность лапароскопического лечения у одних пациенток и отсутствие наступления беременности у других. Ранее полученные данные в отношении возможности диагностики НГЭ на основании определения уровня провоспалительных цитокинов определили необходимость изучения роли именно оксидативного стресса в патогенезе эндометриоз-ассоциированного бесплодия, т.к. известно, что под влиянием провоспалительных цитокинов резко увеличивается образование макрофагами и нейтрофилами перекиси водорода и других свободных радикалов. [Волгина Н.Е. и др. 2016; Agarwal A. et al., 2013]

Нами был применен новый подход выявления оксидантно-антиоксидантных взаимоотношений, основанный не на маркерном подходе, когда проводится изучение отдельных маркеров повреждения оксидативным стрессом ДНК, белков и липидов, а определялся антиоксидантный профиль плазмы крови, перитонеальной и фолликулярной жидкости, описываемый кривыми хемилюминесценции, что позволило оценить обширную совокупность реакций с участием свободных радикалов.

Нами была изучена антиоксидантная активность плазмы крови и перитонеальной жидкости у 36 пациенток с НГЭ. На Рисунок 1 представлены хемилюминограммы антиоксидантного профиля плазмы крови у пациенток с НГЭ.

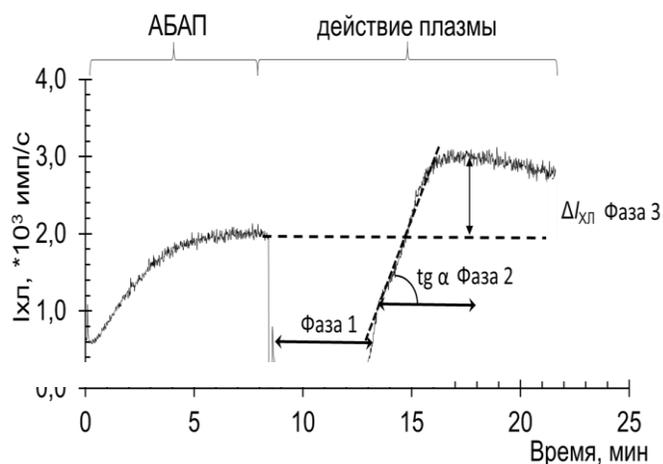


Рисунок 1 - Система генерации свободных радикалов с АБАП в присутствии люминола: I_0 – начальный уровень стационарного свечения (до внесения исследуемого образца плазмы); S – площадь подавляемого свечения за счет действия антиоксидантов; I – уровень стационарного свечения после израсходования антиоксидантов образца; $\Delta I = I - I_0$ – разность между уровнем свечения после внесения образца и начальном уровне стационарного свечения

У пациенток с НГЭ были вычислены следующие показатели антиоксидантного профиля плазмы крови: медиана $Me S_{\text{ПЛАЗМА}} = 371$ (352-405), $Me \Delta I_{\text{ПЛАЗМА}} = 1,5$ (0,9-1,9). Практически у всех пациенток выявлялись изменения свободно-радикального гомеостаза плазмы крови как в сторону снижения антиоксидантов (оксидативный стресс), так и повышения антиоксидантов (антиоксидантный стресс). Оксидативный стресс был выявлен у 47,2% пациенток с НГЭ, антиоксидантный стресс у 30,5%.

Были рассчитаны следующие параметры кинетических кривых в перитонеальной жидкости при НГЭ - $Me S_{\text{ПЖ}} = 400$ (322-458), $Me \Delta I_{\text{ПЖ}} = 1,2$ (1,0-1,5). Так же, как и в плазме крови, в перитонеальной жидкости практически у всех пациенток выявлялись изменения свободно-радикального гомеостаза как в сторону снижения антиоксидантов (оксидативный стресс), так и повышения антиоксидантов (антиоксидантный стресс). Количество пациенток со сниженными показателями антиоксидантной защиты составило 33,3%, повышение антиоксидантной емкости было выявлено в 41,7% наблюдений.

На рисунке 2 показан антиоксидантный профиль плазмы крови и перитонеальной жидкости пациенток с различной стадией НГЭ.

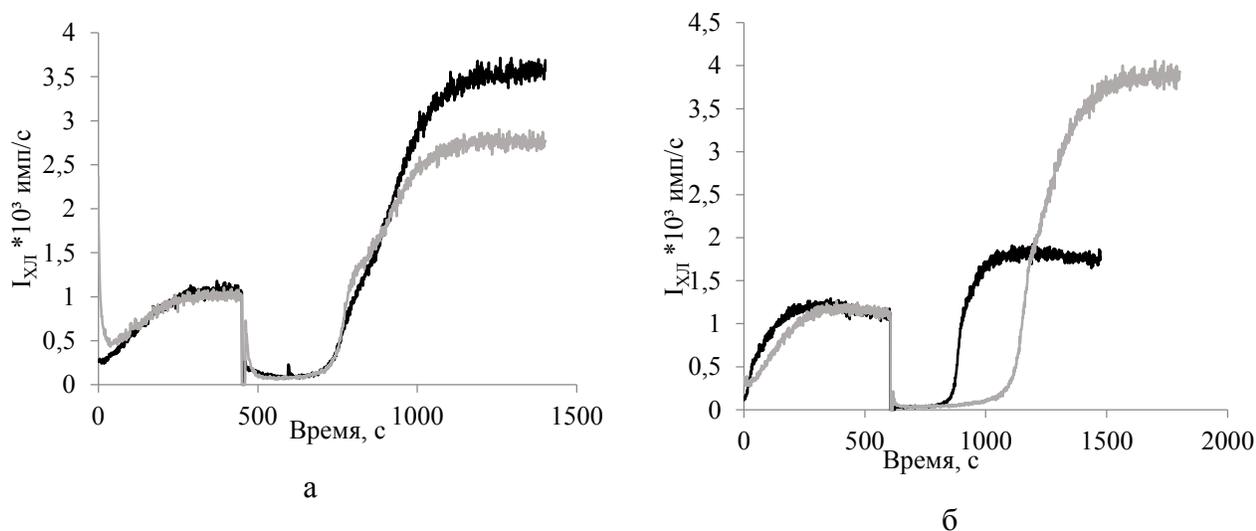


Рисунок 2 - Хемилуминограммы плазмы крови (а) и перитонеальной жидкости (б) пациенток с НГЭ 1-2 стадии (серая кривая) и НГЭ 3-4 стадии (черная кривая)

Оказалось, что параметры S и ΔI не различались в плазме крови у пациенток с НГЭ I-II и III-IV стадиями: $Me S_{\text{ПЛАЗМА}} = 370$ (342-406) и 374 (356-395) соответственно; $Me \Delta I_{\text{ПЛАЗМА}} = 1,3$ (0,6-1,7) и 1,6 (1,3-2,0) соответственно. В перитонеальной жидкости показатели антиоксидантной активности были достоверно повышены ($p < 0,001$) при НГЭ III-IV стадии

($Me S_{ГЖ} = 456 (430-576)$ и $\Delta I_{ГЖ} = 1,5 (1,3-1,7)$) по сравнению с пациентками с НГЭ I-II стадии ($Me S_{ГЖ} = 353 (320-393)$ и $\Delta I_{ГЖ} = 1,0 (0,8-1,27)$)

Мы считаем, что повышение параметра $S_{ГЖ}$, отражающего активацию сильных антиоксидантов - мочевиной кислоты и аскорбата, носят компенсаторный характер в ответ на свойственное пациенткам с тяжелым эндометриозом увеличение активности прооксидантного фермента ксантиноксигеназы. Также нами было выявлено повышение показателя $\Delta I_{ГЖ}$, свидетельствующее об уменьшении уровня окислительной модификации альбумина и увеличении антиоксидантного потенциала системы глутатиона. Окисление глутатиона происходит посредством действия глутатионпероксидазы – основного антиоксидантного фермента для последовательного удаления супероксидного радикала и перекиси водорода, то есть глутатионпероксидаза предотвращает образование чрезвычайно токсичного гидроксильного радикала. Следовательно, повышение $\Delta I_{ГЖ}$, по-видимому, тоже носит компенсаторный характер на свойственный тяжелым формам эндометриоза избыток супероксидного радикала и перекиси водорода.

Наши исследования могут расширить понимание роли окислительно-антиоксидантного баланса в брюшной полости и пагубности сдвигов как в сторону окислительного, так и сторону антиоксидантного стресса. Роль свободно-радикальных изменений в прогрессировании эндометриоза представлена на рисунке 3.

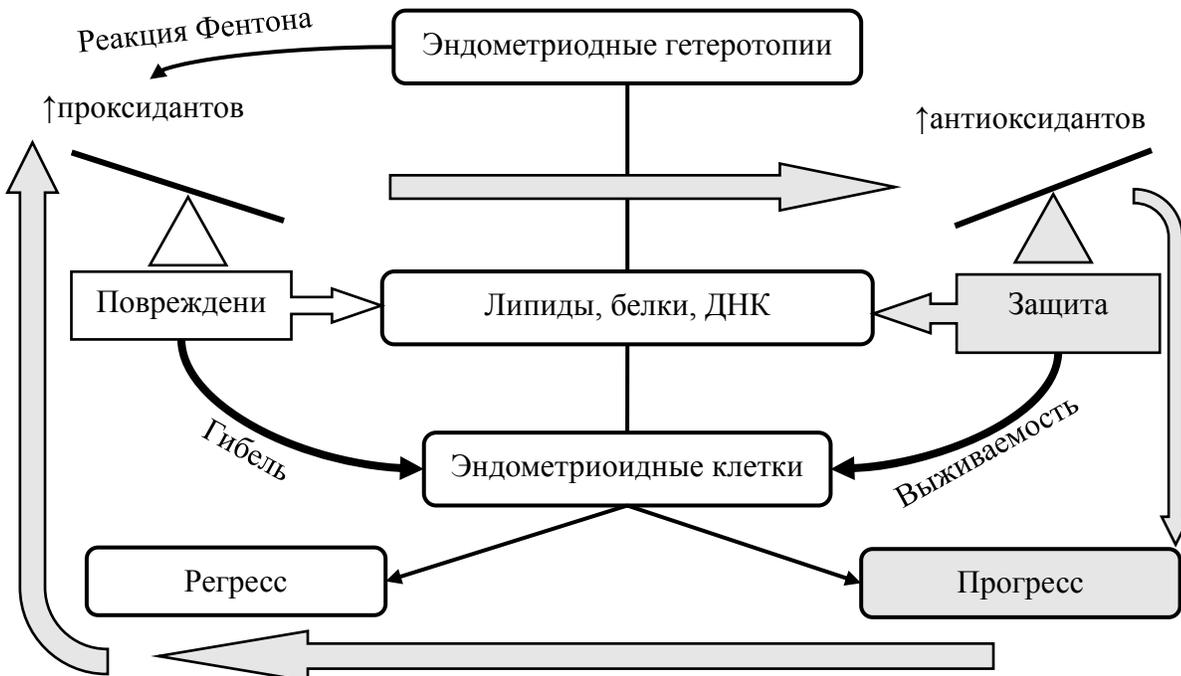


Рисунок 3 - Роль антиоксидантного стресса в прогрессировании эндометриоза

Как следует из рисунка 3, при начальных стадиях эндометриоза вследствие повышенной продукции эндометриодными имплантатами АФК, которые окислительно модифицируют геномную ДНК, вызывая ее повреждение, происходит гибель эндометриальных клеток. Эффективная антиоксидантная функция, в свою очередь, может замедлить гибель клеток и привести к формированию «порочного круга»: большее количество эндометриодных имплантов продуцирует большее количество АФК, что вызывает активацию антиоксидантной защиты и «выживаемость» клеток под действием сублетальных концентраций АФК.

Через один год наблюдения после операции мы сопоставили показатели хемилуминограмм, полученные до этапа хирургического лечения бесплодия, с частотой наступления беременности у 53 пациенток (беременность наступила у 28, из них у 8 после применения ВРТ). Этот анализ позволил выявить новые данные, которые ранее не были описаны в зарубежной или отечественной литературе, относительно роли в генезе эндометриоз-ассоциированного бесплодия как активации антиоксидантной защиты, так и истощение ее резервов в перитонеальной жидкости и плазме крови.

В нашем исследовании не было пациенток с уровнем $S_{\text{ПЛАЗМА}}$ менее 195×10^3 имп/с (референтный уровень), то есть ни у одной пациентки мы не наблюдали дефицита антиоксидантной защиты, обусловленной мочевой кислотой. Частота наступления беременности была несколько выше ($\chi^2=2,9$, $p=0,02$) у пациенток с исходной антиоксидантной избыточностью мочевой кислоты (76,9%) по сравнению с нормальным уровнем антиоксидантной защиты (40,0%). По показателю $\Delta I_{\text{ПЛАЗМА}}$, характеризующему антиоксидантную активность альбумина, оказалось, что оксидативный стресс наблюдался у 29 из 53 пациенток, а антиоксидантная избыточность у 17 обследованных. При сопоставлении исходного уровня антиоксидантной активности альбумина и частоты наступления беременности были выявлены достоверные различия ($\chi^2=10,9$, $p=0,02$). Причем наибольший процент наступления беременности наблюдался при антиоксидантной избыточности альбумина – 57,1%. У пациенток с исходным оксидативным стрессом по белковому показателю беременность наступила в 69,4% наблюдений. При нормальных значениях

$\Delta I_{\text{ПЛАЗМА}}$, напротив, частота наступления беременности была наименьшей и составила – 20,0%.

На рисунке 4 представлены хемилюминограммы плазмы крови и перитонеальной жидкости пациенток с наступлением и отсутствием наступления беременности.

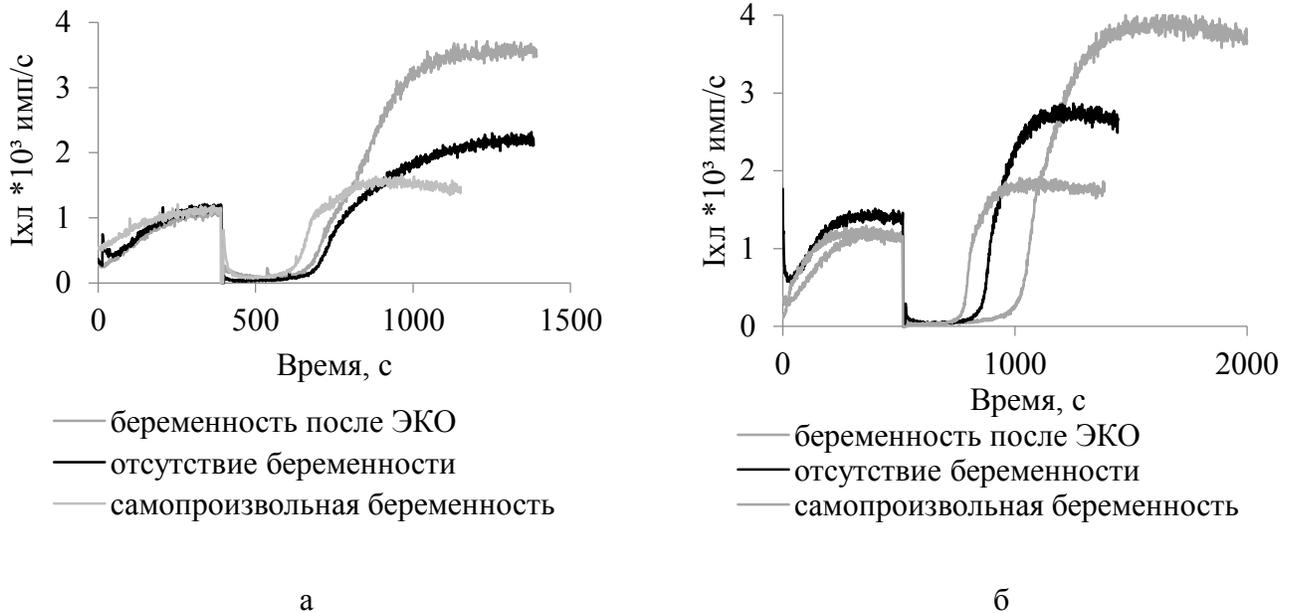


Рисунок 4 - Хемилюминограммы плазмы крови (а) и перитонеальной жидкости (б) пациенток с наступлением и отсутствием наступления беременности

Проведенный анализ показал, что у всех пациенток показатель $S_{\text{ПДЖ}}$ превышал 240×10^3 имп/с. При избытке сильных антиоксидантов в перитонеальной жидкости ($S_{\text{ПДЖ}}$ более 450×10^3 имп/с), также как и в плазме крови, беременность наступала чаще, чем при нормальном значении $S_{\text{ПДЖ}}$ (76,9% против 40,0%). Количество забеременевших пациенток было выше и при увеличенной антиоксидантной активности альбумина – 66,7%. При оксидативном стрессе по белковому показателю частота наступления беременности тоже была высокой и составила 69,2%. При «нормальном» исходном уровне показателя $\Delta I_{\text{ПДЖ}}$, напротив, беременность наступила у наименьшего количества пациенток - у 12,5%.

Полученные нами данные объяснили возможность наступления самопроизвольной беременности после лапароскопии даже при тяжелых формах эндометриоза: хирургическое удаление эндометриоидных очагов приводило к устранению оксидантно-антиоксидантного дисбаланса. Важнейшим фактором, определяющим успех оперативного вмешательства,

являлась тщательность иссечения и коагуляции всех эндометриоидных гетеротопий. Таким образом, мы предполагаем, что наступлению беременности при НГЭ препятствует как недостаток, так и избыток антиоксидантов.

Параллельно с исследованиями перитонеальной жидкости и плазмы крови у пациенток с НГЭ, проводилось изучение локального оксидантно-антиоксидантного статуса в эндометриодной кисте и ее окружении. Дизайн этого этапа исследования включал изучение прооксидантных свойств эндометриодной кисты (n=22), активности редуктазных ферментов в стенке эндометриодной кисты (n=38) и ткани, прилежащей к ней (n=38). Сравнение редокс-статуса ткани яичника, содержащей эндометриоидную кисту, проводилось с тканью яичника в отсутствии эндометриоза (n=20). Пациентки с НГЭ и контрольной группы были сопоставимы по возрасту и показателям овариального резерва, оцененным по УЗИ и гормональному профилю.

Нами было показано, что содержимое эндометриодной кисты, представляющее собой продукт превращения гемоглобина, является основным источником свободных радикалов (рисунок 5).

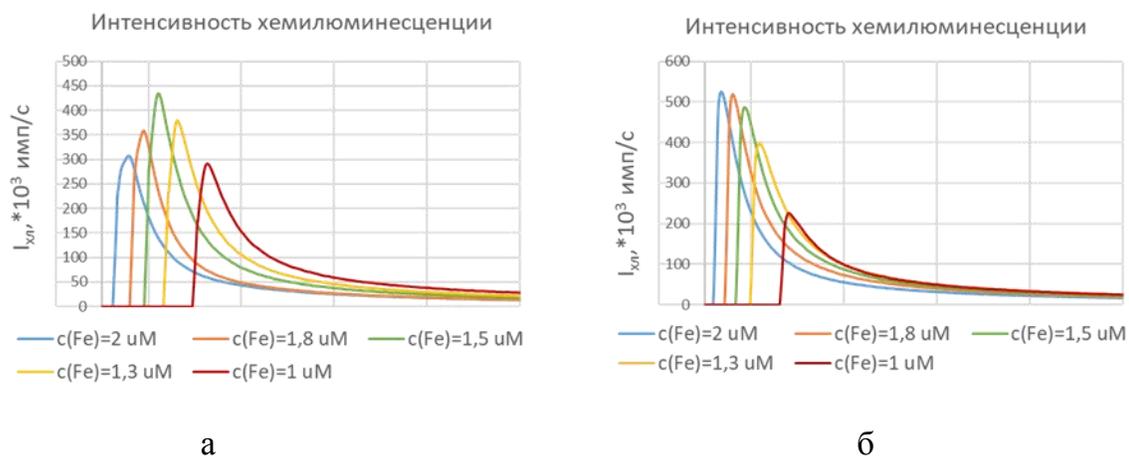


Рисунок 5 - Хемилюминограммы гемоглобина (а) и содержимого кисты (б) с линолевой кислотой в присутствии кумарина С-334

Представленные результаты указывают, что прооксидантная активность, оцениваемая по светосумме под кривыми, содержимого кисты была выше в 8-10 раз, чем прооксидантная активность гемоглобина, а амплитуда сигнала коррелировала с размером кисты – больший уровень активности соответствовал кистам большего размера.

Более приближенной к реальным условиям является модель с фосфолипидами (Рисунок).

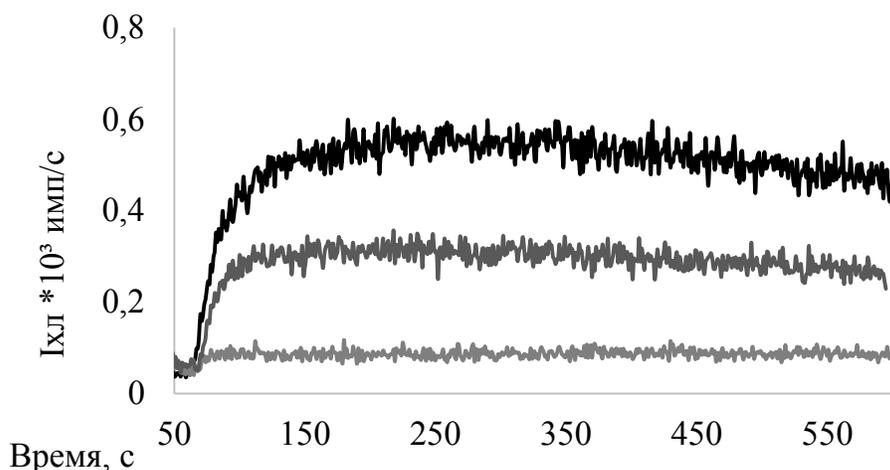


Рисунок 6 - Хемилюминограммы содержимого эндометриодных кист различного размера в системе с фосфолипидами и кумарином С-334, концентрация гемового железа во всех пробах равна 550 мкмоль/л. Кисты размером 2 см (нижняя кривая), 4 см (средняя кривая) и 7 см (верхняя кривая)

Анализ хемилюминограмм установил, что окисление фосфолипидов описывалось стационарной кинетикой, характерной для ферментов пероксидаз/липопероксидаз, при этом амплитуда сигнала, определяющая прооксидантную активность, коррелировала с размером кисты – меньший уровень активности соответствовал кистам меньшего размера. Вероятно, чем «старше» киста, тем более активен с точки зрения окислительных свойств продукт распада гемоглобина. Высокая прооксидантная активность содержимого эндометриомы подтверждает наше предположение о существенно более важной роли оксидативного стресса в повреждении окружающей ткани яичника по сравнению с другими типами кист.

Защита ткани яичника от избыточной продукции АФК осуществляется с помощью антиоксидантной системы. Нами была сопоставлена активность антиоксидантного фермента НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы в ткани яичника, содержащего эндометриодную кисту, и яичнике без кисты (рисунок 7).

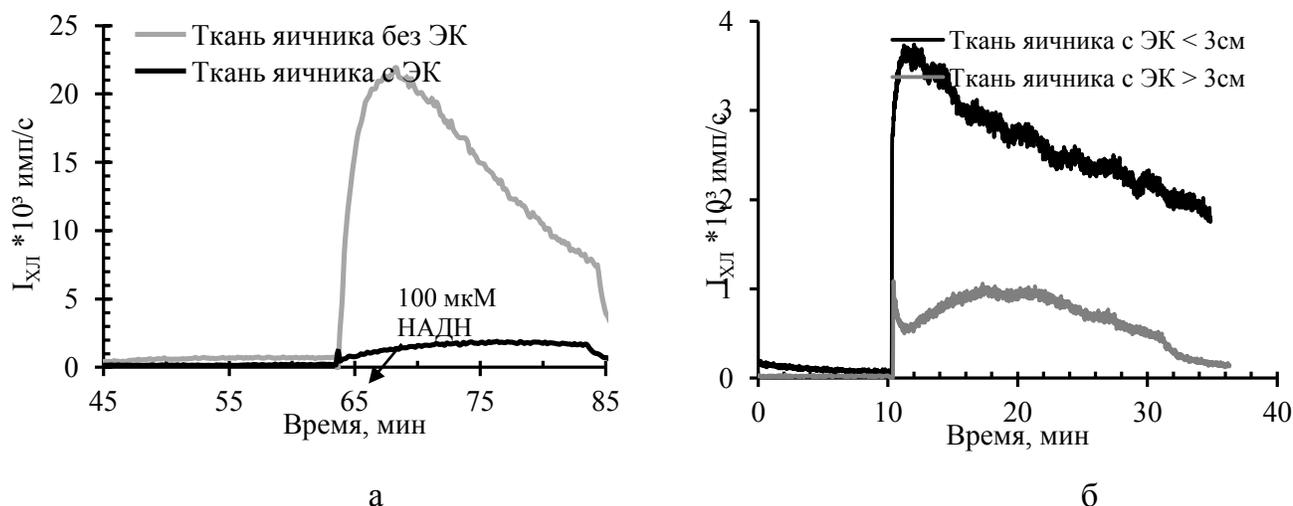


Рисунок 7 - Хемилуминограммы и коэффициент активации ткани яичника, содержащего ЭК по сравнению с тканью яичника без ЭК (а); ткани яичника, содержащей ЭК менее и более 3 см (б): I_0 – интенсивность хемилуминесценции после добавления люцигенина, $I_{НАДН}$ – интенсивность хемилуминесценции после добавления НАДН (никотинамидадениндинуклеотида).

Примечание: ЭК-эндометриодная киста

Сравнение собственного свечения ткани яичника и стенки эндометриодной кисты показало, что собственная радикал-продуцирующая способность стенки эндометриодной кисты ($I_0=0,17 (0,09-0,41) \cdot 10^3$ имп/с) была несколько выше, чем ткани яичника ($I_0=0,12 (0,05-0,29) \cdot 10^3$ имп/с), причем максимальные значения были зарегистрированы в кистах более 3 см ($I_0=1,6 (0,5-2,5) \cdot 10^3$ имп/с). То есть в строме яичника, содержащей эндометриодную кисту, не происходит избыточного образования радикал-анионов, тогда как сама эндометриодная киста способна продуцировать АФК.

НАДН-стимулированная хемилуминесценция достоверно ($p=0,03$) сильнее возростала в ткани яичника, непораженного эндометриозом ($I_{НАДН}=5,8 (1,5-14,6) \cdot 10^3$ имп/с) в сравнении с яичником, содержащим кисту ($I_{НАДН}=1,8 (1,12-2,9) \cdot 10^3$ имп/с), что свидетельствует об исчерпании резервов антиоксидантной защиты в ткани яичника, окружающей эндометриодную кисту. Недостаток активности редуказной системы может приводить к запуску цитохром *c* индуцированной гибели митохондрий, апоптозу клетки и, как следствие, к снижению овариального резерва. При этом в яичнике с кистой более 3 см активность антиоксидантной защиты была выражена слабее, что предположительно объясняет более серьезное повреждение овариального резерва при больших эндометриомах.

Сопоставление результатов экспериментальных исследований с клиническими данными выявили умеренную прямую корреляцию (коэффициент корреляции Спирмена 0,59, $p = 0,03$) между коэффициентом активации ткани яичника и уровнем АМГ, то есть у пациенток с низким овариальным резервом активность НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы ткани яичника была ниже. При этом у части пациенток с эндометриодными кистами было обнаружено снижение коэффициента активации даже при нормальном уровне АМГ. Соответственно, при наличии эндометриоза даже при сохранном овариальном резерве уже происходит угнетение антиоксидантной защиты и повреждение ткани яичника, еще до хирургического лечения.

Таким образом, содержимое эндометриомы является источником свободных радикалов, нейтрализация которых происходит, в том числе за счет активации НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы, а при исчерпании резервов антиоксидантной защиты запускается цитохром c индуцированная гибель митохондрий в микроокружении эндометриодной кисты яичника, приводящая к снижению овариального резерва. Это свидетельствует о негативном влиянии на овариальный резерв не только удаления эндометриодных кист вследствие повреждения во время диссекции и коагуляции коркового слоя яичника, но само существование эндометриом «убивает» фолликулярный запас.

Следующая серия исследований была посвящена процедуре ЭКО у пациенток с НГЭ. На сегодняшний день ЭКО является наиболее эффективным методом преодоления всех форм бесплодия. Мы придерживаемся традиционной точки зрения, что лапароскопия показана для лечения бесплодия только у молодых пациенток с сохранным овариальным резервом, тогда как в остальных ситуациях достижение беременности при НГЭ возможно путем применения ВРТ (Клинические рекомендации «Женское бесплодие (современные подходы к диагностике и лечению)», 2019). Нами были изучены особенности процедуры ЭКО у 50 пациенток с НГЭ. Группу сравнения составили 52 пациентки с ТПБ.

Анализ эффективности настоящей попытки ЭКО выявил отсутствие значимых различий в частоте наступления беременности, рассчитываемой на перенос эмбриона, у пациенток с НГЭ и ТПБ (40,4% и 38,0% соответственно). Известно, что результативность ЭКО во многом определяется возрастом пациентки, состоянием овариального резерва яичников, количеством полученных ооцитов и качеством эмбрионов. Для исключения

влияния протокола стимуляции суперовуляции на исследуемые параметры в исследование включались только пациентки с короткой схемой стимуляции с применением ант-ГнРГ. Возраст и показатели овариального резерва у пациенток двух изучаемых групп также были схожими. Следовательно, можно предположить, что ответ яичников на стимуляцию в цикле ЭКО и качество эмбрионов определялись генезом бесплодия включенных в исследование пациенток.

В настоящем исследовании был выявлен существенно более бедный ответ яичников в протоколе ЭКО у пациенток с НГЭ по сравнению с ТПБ: при НГЭ было получено $4,6 \pm 2,23$ ооцита, при ТПБ $10,67 \pm 7,5$ ооцитов ($p < 0,05$). При этом пациенткам с эндометриоз-ассоциированным бесплодием была введена достоверно ($p < 0,05$) большая доза рекомбинантного ФСГ в сравнении с группой ТПБ (2542 ± 98 МЕ и 2205 ± 115 МЕ соответственно). Несмотря на то, что количество пациенток, которым проводилась повторная попытка ЭКО, в двух группах было сопоставимым, мы посчитали необходимым сравнить ответ яичников в первую или единственную попытку ЭКО. При первой стимуляции суперовуляции у пациенток с НГЭ было получено $6,7 \pm 4,8$ ооцитов, что достоверно меньше, чем у пациенток с ТПБ - $11,0 \pm 6,25$ ооцитов.

Отдельно нами был проанализирован вклад различных факторов в успешность цикла ЭКО (таблица 4).

Таблица 4 – Предикторы наступления беременности после ЭКО при эндометриоз-ассоциированном бесплодии

Предиктор наступления беременности	Отношение шансов	95 % ДИ	p
Возраст менее 35 лет	0,58	0,17-2,07	$p > 0,05$
Первичное бесплодие	1,31	0,39-4,32	$p > 0,05$
Роды в анамнезе	1,11	0,22-5,63	$p > 0,05$
Длительность бесплодия менее 3 лет	6,36	1,75-23	$p < 0,05$
Эндометриоз I-II стадии	5,89	1,65-21	$p < 0,05$
Резекция яичников в анамнезе	1,31	0,39-4,32	$p > 0,05$
Уровень АМГ $\leq 0,6$ нг/мл	0,64	0,14-2,9	$p > 0,05$
Уровень ФСГ ≥ 10 МЕ/л	0,19	0,04-0,82	$p < 0,05$
Число антральных фолликулов по данным УЗИ ≤ 5	0,10	0,03-0,39	$p < 0,05$
Число ооцитов > 8 в данную попытку ЭКО	2,67	1,74-9,59	$p < 0,05$

Суммируя представленные в таблице 4 данные можно сделать выводы, что наибольшая частота наступления беременности наблюдалась у пациенток с I-II стадиями эндометриоза с длительностью бесплодия менее 3 лет и при пункции более 8 ооцитов; тогда как уменьшение эффективности ЭКО было выявлено при сниженных показателях овариального резерва по данным УЗИ и гормонального исследования, сопровождающихся более бедным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции.

Для завершения комплекса исследований относительно роли свободно-радикального дисбаланса при эндометриоз-ассоциированном бесплодии нами было проведено изучение показателей оксидантно-антиоксидантного профиля фолликулярной жидкости у 51 пациентки, проходящей лечение в программе ЭКО. Суммируя данные проведенного анализа хемилюминограмм, можно сделать вывод, что в фолликулярной жидкости у подавляющего числа пациенток выявлялся оксидативный стресс, затрагивающий в первую очередь белковое звено: увеличение уровня окислительной модификации альбумина и снижение антиоксидантного потенциала системы глутатиона. При оксидативном стрессе в фолликулярной жидкости, затрагивающем белковое звено, нарушается функциональная способность клеток гранулезы к выработке прогестерона. Из-за отсутствия достаточной гормональной поддержки прогестероном созревание ооцитов замедляется, что негативно влияет на последующие процессы, включая оплодотворение, образование бластоцисты и развитие эмбрионов. Снижение антиоксидантного потенциала системы глутатиона свидетельствует о снижении активности клеток гранулезы и косвенно отражает недостаточную зрелость ооцитов.

Далее нами было оценено влияние схем стимуляции суперовуляции и препаратов, применяемых для анестезии, на показатели оксидантно-антиоксидантного профиля фолликулярной жидкости. Мы предположили, что изучение этих параметров будет являться резервом для улучшения эффективности ЭКО у пациенток с НГЭ. Выявлено что применение схем стимуляции суперовуляции а-ГнРГ усугубляет оксидативный стресс в фолликулярной жидкости: он выявлялся у 41,2%, у которых применялись а-ГнРГ против 16,1% при использовании ант-ГнРГ. Развитие оксидативного стресс в длинных протоколах может быть связано с использованием больших доз гонадотропинов по сравнению с короткими циклами.

Известно, что с увеличением дозы гонатропинов наблюдается нарастание индекса оксидативного стресса в фолликулярной жидкости.

Впервые в нашем исследовании было показано достоверное повышение антиоксидантной емкости фолликулярной жидкости при использовании севофлурана (Ме $S = 395$ (229; 696)), по сравнению с пациентками, получавшими пропофол (Ме $S = 306$ (84; 630), $p=0,01$) и пациентками, у которых пункция ооцитов проводилась без анестезии (Ме $S = 272$ (45; 538), $p=0,02$). Защитные свойства севофлурана обусловлены эффектом прекондиционирования и сохранением уровней АТФ во время ишемии, снижением адгезии полиморфноядерных нейтрофилов, увеличением продукции оксида азота и ингибированием продукции свободных радикалов.

При сопоставлении показателей оксидантно-антиоксидантного профиля фолликулярной жидкости и качества эмбрионов было установлено, что при получении эмбрионов хорошего качества ($n=14$) оксидативный стресс в фолликулярной жидкости хотя бы по одному показателю был выявлен у 28,6% пациенток, у пациенток со средним качеством эмбрионов ($n=21$) оксидативный стресс наблюдался у 23,8%, с плохим качеством ($n=16$) – у 62,5%. При сравнении уровня оксидативного стресса у пациенток с плохим качеством эмбрионов против пациенток с хорошим и средним качеством различия были достоверными ($p<0,05$). По-видимому, нарушения оксидантно-антиоксидантного состояния фолликулярной жидкости определяют дальнейшее качество эмбрионов.

Заключительная часть исследований посвящена особенностям течения беременности у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием. Нами были сопоставлены особенности течения беременности у пациенток, у которых эндометриоз являлся причиной бесплодия и лапароскопическое удаление эндометриодных гетеротопий привело к самопроизвольному наступлению беременности ($n=110$), с течением беременности на фоне эндометриом ($n=90$). Следует отметить, что более чем у половины пациенток эндометриомы были выявлены только во время беременности, а у части из них они явились «случайной» находкой во время оперативного родоразрешения путем кесарева сечения. В качестве группы сравнения ($n=13206$) использовались данные о течении беременности и родов ГБУЗ города Москвы "Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы" за 2016 год, включавшем в том числе данные по 15 женским консультациям.

В нашем исследовании не было выявлено осложнений (перекрут, разрыв) со стороны эндометриоидных кист во время беременности. Наиболее частым осложнением течения беременности в обеих группах пациенток явилась угроза прерывания беременности, которая выявлялась у 18,2% беременных с эндометриоз-ассоциированным бесплодием в анамнезе (из них у 26,8% в отсутствие прегравидарной подготовки и у 9,2% при ее применении) и 33,3% пациенток с эндометриодными кистами. Частота угрозы прерывания беременности в группе сравнения составила 16,8%, что достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группе с эндометриоидными кистами яичников. Следует отметить, что в более поздние в сроки беременности частота угрозы прерывания уменьшилась и не отличалась как у пациенток обеих исследуемых групп, так и по сравнению с популяционными данными. Угроза преждевременных родов была диагностирована у 10,5% 13,3% и 8,7% пациенток в группах №1, №2 и группе сравнения соответственно.

В нашем исследовании высокая частота прерывания беременности наблюдалась только при наличии эндометриоидных кист, тогда как у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием она была ниже. Эти данные можно объяснить тем, что большинство пациенток с НГЭ забеременели в течение года после проведенного удаления эндометриоидных очагов, которое, по-видимому, привело к уменьшению воспалительных реакций и снижению уровня оксидативного стресса. С другой стороны, подавляющее число пациенток, перенесших лапароскопическое лечение бесплодия, получали гормональную терапию гестагенами, начиная с ранних сроков беременности ($n = 42$) или на этапе прегравидарной подготовки ($n = 54$), что, по-видимому, также объясняет меньшую частоту прерывания беременности в этой когорте пациенток. Мы считаем, что у молодых пациенток с хорошим овариальным резервом и нормальными показателями спермограммы партнера после проведенного хирургического лечения эндометриоза в комплексную терапию должна включаться прегравидарная подготовка, которая не только способствует наступлению беременности, но и улучшает течение и исход беременности. Большинство пациенток с лапароскопическим лечением эндометриоз-ассоциированного бесплодия были первобеременными и первородящими, однако у 6,6% пациенток этой группы было выявлено предлежание плаценты, которое в большей мере характерно для повторнобеременных пациенток, причем у 5 из 7 пациенток во время лапароскопии проводилось иссечение ретроцервикального

эндометриоза. Частота преэклампсии у пациенток с НГЭ не повышалась по сравнению с популяционными данными. Умеренная преэклампсия была диагностирована у 5,7% беременных с бесплодием в анамнезе и 6,7% с эндометриодными кистами, случаев тяжелой преэклампсии выявлено не было.

Небольшой процент осложнений течения второй половины беременности у обследованных пациенток не привел к увеличению частоты преждевременных родов. Преждевременные роды наблюдались с одинаковой частотой в обеих группах: у 6,7% пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием в анамнезе и у 6,7% пациенток с эндометриодными кистами яичников. При сравнении частоты преждевременных родов с данными ЦПСИР за 2016 год (4,21%) достоверных различий также не было выявлено. Также мы не обнаружили различий в частоте перевода новорожденных на второй этап выхаживания у пациенток с образованиями яичников по сравнению с общей популяцией. На второй этап выхаживания были переведены 10,0% пациенток с эндометриодными кистами и 10,4% в группе сравнения.

Таким образом, в настоящем исследовании была изучена роль свободно-радикального дисбаланса в патогенезе эндометриоз-ассоциированного бесплодия (рисунок 8).

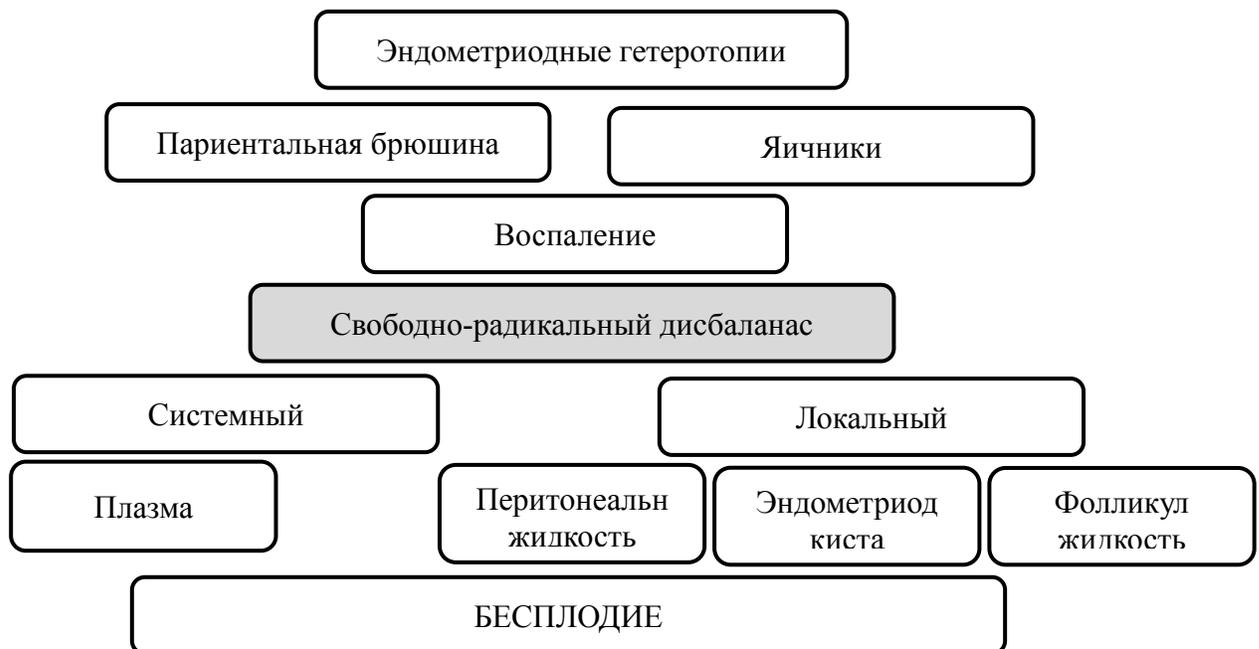


Рисунок 8 - Роль свободно-радикального дисбаланса в патогенезе эндометриоз-ассоциированного бесплодия

Изменения редокс-статуса, приводящие к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия, были изучены как на системном уровне (изменения цитокинового и антиоксидантного статуса в плазме крови), так и на локальном уровне (изменения свободно-радикального гомеостаза в перитонеальной жидкости, микроокружении эндометриодной кисты, фолликулярной жидкости), что позволило уточнить патогенез НГЭ и создать современную концепцию восстановления репродуктивной функции пациенток с этой патологией. Было показано, что снижение репродуктивного потенциала пациенток с эндометриозом во многом было связано с развитием свободно-радикального дисбаланса. А успех лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия во многом определялся достижением свободно-радикального баланса как на локальном, так и на системном уровнях. Важное значение при этом имели своевременность и квалифицированность хирургического лечения с тщательной элиминацией всех эндометриодных гетеротопий и бережной энуклеацией эндометриодных кист.

Хорошие шансы на самопроизвольное наступление беременности после лапароскопии имеют пациентки в возрасте до 32 лет, с длительностью бесплодия до 3 лет, с отсутствием поражения эндометриозом яичников или односторонними эндометриодными кистами до 6 см и сохранным овариальным резервом. Несмотря на то, что хирургическое лечение эндометриоза значительно улучшает показатели фертильности, оно не позволяет полностью восстановить репродуктивный потенциал женщины и решить всех проблем, связанных с эндометриозом. Существует необходимость в комбинированных вариантах хирургического и консервативного лечения. Проведение прегравидарной подготовки во многом способствует улучшению результатов операции по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия, а также улучшает перинатальные исходы при наступлении беременности. У ряда пациенток единственным методом достижения беременности является применение вспомогательных репродуктивных технологий. ВРТ у пациенток с НГЭ рекомендуется проводить по коротким протоколам с антагонистами Гн-РГ, а в качестве анестетика использовать севофлуран. На основании полученных данных разработан алгоритм ведения пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием (рисунок 9).

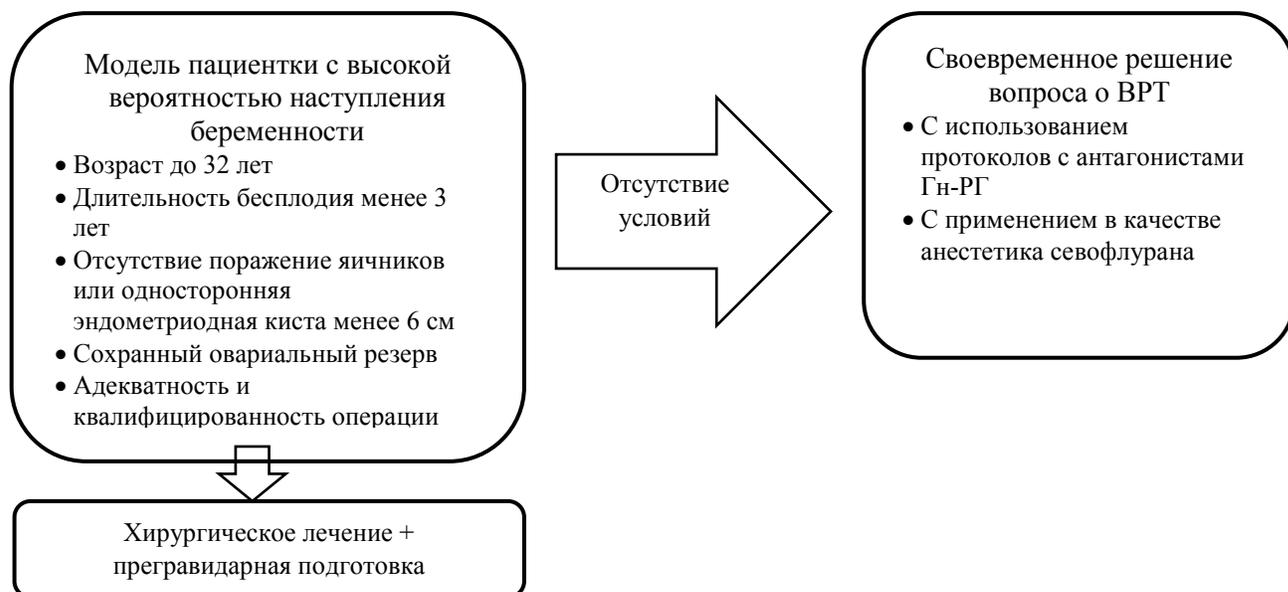


Рисунок 9 - Алгоритм ведения пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием

Таким образом, предложенный комплексный подход к ведению пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием, сформированные с позиций доказательной медицины, будет способствовать восстановлению репродуктивного потенциала у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

ВЫВОДЫ

1. Важным звеном патогенеза распространенных форм наружного генитального эндометриоза (III-IV стадии) является активация локальной антиоксидантной функции: показатели антиоксидантного профиля перитонеальной жидкости в 1,5 раза выше таковых при наружном генитальной эндометриозе I-II стадии. Состояние системного антиоксидантного профиля (плазма крови) не зависит от стадии эндометриоза.

2. В генезе бесплодия, обусловленного наружным генитальным эндометриозом, важную роль играет как активация антиоксидантной защиты, так и истощение ее резервов в перитонеальной жидкости и плазме крови, то есть наступлению беременности при наружном генитальном эндометриозе препятствует как недостаток антиоксидантов (у 30% пациенток в плазме крови и у 44% в перитонеальной жидкости), так и их избыток (у 48% пациенток в плазме крови и у 35% в перитонеальной жидкости).

3. Содержимое эндометриодной кисты является сильным прооксидантом – источником активных форм кислорода, инициирующим свободно-радикальный дисбаланс в

стенке кисты, степень которого находится в прямой зависимости от ее размеров, а также в прилежащей ткани яичника. Для устранения редокс-дисбаланса в стенке эндометриодной кисты, происходит активация антиоксидантной защиты (НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы), истощение резервов которой приводит к снижению овариального резерва

4. Частота окислительного стресса в фолликулярной жидкости не зависит от генеза бесплодия и составляет 50% – при наружном генитальном эндометриозе, 72% – при трубно-перитонеальном бесплодии и 45% – в позднем репродуктивном возрасте пациенток, проходящих лечение в программе ЭКО.

5. Наиболее эффективным в программе ЭКО у пациенток с бесплодием является применение схем стимуляции суперовуляции с антагонистами гонадотропин релизинг-гормона, при которых частота окислительного стресса в фолликулярной жидкости снижается до 16% (против 38% при использовании агонистов гонадотропин релизинг-гормона). Препаратом выбора при анестезии трансвагинальной пункции ооцитов является севофлуран, способствующий снижению частоты окислительного стресса до 17% (против 55% при использовании пропофола). Эффективность ЭКО при эндометриоз-ассоциированном бесплодии составляет 40%.

6. Эффективность восстановления естественной фертильности при бесплодии, обусловленном наружным генитальным эндометриозом, независимо от его формы, после хирургического удаления эндометриодных гетеротопий составляет 31% и повышается до 54% после проведения комплексной прегравидарной подготовки.

7. Хирургическая элиминация очагов эндометриоза - источников локального окислительного и антиоксидантного стресса - приводит к восстановлению свободно-радикального баланса и способствует наступлению беременности у 68% пациенток при исходном недостатке антиоксидантной защиты и у 62% при высоком уровне антиоксидантной защиты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для диагностики наружного генитального эндометриоза I-II стадий целесообразно включать совместное определение интерлейкина-6 и СА-125.

2. Хорошие шансы на самопроизвольное наступление беременности после хирургического лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия имеют пациентки в

возрасте до 32 лет, с длительностью бесплодия до 3 лет, с отсутствием поражения эндометриозом яичников или односторонними эндометриоидными кистами до 6 см и сохранным овариальным резервом. Хирургическое лечение должно проводиться квалифицированным хирургом и включать тщательную элиминацию всех эндометриоидных гетеротопий.

3. Прогностически благоприятным ультразвуковым критерием наступления самопроизвольной беременности после удаления эндометриоидных кист является наличие доминантного фолликула и число антральных фолликулов более 5.

4. Послеоперационное ведение пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием должно дополняться прегравидарной подготовкой по индивидуальной подобранной схеме с включением гормональных и вазоактивных препаратов.

5. Выжидательная тактика в отношении эндометриоидных кист должна быть ограничена в связи с высокой вероятностью повреждения овариального резерва за счет редокс-дисбаланса, возникающего в окружении кисты.

6. ЭКО по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия целесообразно проводить по коротким протоколам стимуляции суперовуляции с антагонистами гонадотропин рилизинг-гормона и использовать в качестве анестетика севофлуран.

7. Показатели оксидантно-антиоксидантного профиля фолликулярной жидкости являются перспективными маркерами прогностических критериев развития и имплантационных способностей эмбриона и могут использоваться в дополнение к традиционным оценкам качества эмбрионов, основанных на скорости их развития и морфологических особенностях.

8. Уменьшению частоты угрозы прерывания и как следствие снижению репродуктивных потерь в I триместре беременности у пациенток с самопроизвольно наступившей беременностью после лапароскопии по поводу эндометриоз-ассоциированного бесплодия способствует прегравидарная подготовка, направленная на адаптацию сосудистой системы матки к беременности.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Перспективной и требующей дальнейшей разработки мы считаем методику изучения системного и локального редокс-статуса методом активированной хемилюминесценции среди пациенток с бесплодием.

Выявление этиопатогенетических факторов влечет разработку оптимальных методов диагностики и лечения наружного генитального эндометриоза и ассоциированного с ним бесплодия. Персонализация прегравидарной подготовки с учетом выявленного оксидативного или антиоксидантного стресса будет способствовать восстановлению как естественной фертильности, так и оптимизации критериев отбора пациенток с бесплодием для проведения ВРТ. Показатели свободно-радикального гомеостаза фолликулярной жидкости у пациенток в программах ЭКО являются перспективными маркерами прогностических критериев развития и имплантационных способностей эмбриона и могут использоваться в дополнение к традиционным оценкам качества эмбрионов для переноса, основанных на скорости их развития и морфологических особенностях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Щербакова, Л.Н. Внутриматочная перфузия и полиморфизм генов ангиогенеза у пациенток с неудачными результатами экстракорпорального оплодотворения. / Е.Ю. Троскина, М.В. Белокурова, Е.Ю. Бугеренко, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** - 2012. - № 5. - С. 36-40.
2. Щербакова, Л.Н. Цитокины и онкомаркеры в диагностике малых форм эндометриоза. / Н.В. Иванова, О.Б. Панина, А.Е. Бугеренко, Н.Л. Шимановский, М.Г. Фомина // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии** – 2012. –№ 4. - С. 47-52
3. Щербакова, Л.Н., Роль аллельного полиморфизма генов цитокинов и факторов ангиогенеза в нарушениях рецептивности эндометрия. / М.В. Белокурова, Е.Ю. Троскина, О.Б. Панина, А.Е. Бугеренко // **Материалы 1-го Национального конгресса по регенеративной медицине** – 2013. - С. 363-364
4. Shcherbakova, L. Endometrial and subendometrial blood flow and polymorphisms in angiogenesis-related genes in women with repeated implantation failure following ivf-et / E.Troskina., M. Belokurova, A. Bугerenko, L. Samohodskaya, O. Panina // **Journal of Perinatal Medicine**- 2013. – Vol. 41
5. Shcherbakova, L. Serum Markers of Antioxidant Status in Women with Endometriosis Related Infertility / N. Ivanova, M. Khatlamadzhian, E. Kalenikova, O. Panina // **Gynecological Surgery.** -2015. - Vol. 12, Supplement 1 - S320

6. Shcherbakova, L. Identification of the Causes of Female Infertility / N. Ivanova, K. Bugerenko, A. Bugerenko, O. Panina // *Gynecological Surgery*. – 2015.- Vol. 12, Supplement 1 - S321
7. Щербакова, Л.Н. Непроходимость маточных труб: верификация диагноза. / К.А. Бугеренко, А.Е. Бугеренко, О.Б. Панина // **Врач** – 2015 - № 9 - С. 37-40
8. Щербакова, Л.Н. Предупреждение развития синдрома гиперстимуляции яичников в программе экстракорпорального оплодотворения / Н.В. Иванова, А.Е. Бугеренко, О.Б. Панина // **Российский медицинский журнал**. - 2015.- Т. 21 № 1. - С. 28-31
9. **Патент на изобретение** «Способ диагностики наружного генитального эндометриоза у пациенток с бесплодием» М.Г. Хатламаджиян, Е.В. Харитонова, Л.Н. Щербакова, О.Б. Панина, Е.И. Каленикова № 2599019 от 6.06.2015
10. **Патент на изобретение** «Способ улучшения рецептивности эндометрия у пациенток с бесплодием, ассоциированным с эндометриозом» М.Г. Хатламаджиян, Е.В. Харитонова, Л.Н. Щербакова, О.Б. Панина, Е.И. Каленикова. № 2597845 от 25.06. 2015
11. Щербакова, Л.Н. Бесплодие. Эффективность хирургического лечения. / К.А. Бугеренко, А.Е. Бугеренко, О.Б. Панина, Л.М. Самоходская, А.В. Балацкий // **Врач**. - 2017.- № 8. - С. 29-31
12. Щербакова, Л.Н. Внутриматочная перфузия и дисплазия соединительной ткани при бесплодии и привычном невынашивании беременности. / Т.Е. Филипенкова, О.Б. Панина// *Материалы конгресса "XI Международный конгресс по репродуктивной медицине"*- 2017 - С. 116
13. Щербакова, Л.Н. Локальный оксидативный статус яичников пациенток с эндометриодными кистами. / К.В. Ларин, К.А. Бугеренко, О.Б. Панина, Е.В. Проскурнина // *Кислород и свободные радикалы*. – 2018. -С. 103-105
14. Щербакова, Л.Н. Прогнозирование наступления беременности на основе оценки перфузии матки при помощи доплерометрии сосудов матки. / П.А. Леонова, Т.Е. Филипенкова, М.В. Алексеенкова, // *Материалы XII Международного конгресса по репродуктивной медицине*. – 2018. - С. 88-90
15. Щербакова, Л.Н. Хирургическое лечение и прегравидарная подготовка пациенток с бесплодием, обусловленным наружным генитальным эндометриозом / П.А. Гаврикова,

- А.А. Куприян // Материалы XII Международного конгресса по репродуктивной медицине – 2018. - С. 547-549
16. Щербакова, Л.Н. Значение медикаментозной прегравидарной подготовки в реализации репродуктивной функции при бесплодии, обусловленном наружным генитальным эндометриозом. / П.А. Гаврикова, А.А. Куприян, А.Е. Бугеренко, О.Б. Панина // **Клиническая фармакология и терапия.** – 2018. – Т. 27, № 4. - С. 18-22
17. Щербакова, Л.Н. Маркеры системы антиоксидантной защиты в диагностике наружного генитального эндометриоза у пациенток с бесплодием. / М.Г. Хатламаджиян, Е.В. Харитонова., У.С. Анисимова, А.Е. Бугеренко, Е.И. Каленикова, О.Б. Панина // **Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва.** – 2018. – Т. 5, № 2. - С. 97-100
18. Щербакова, Л.Н. Причины снижения овариального резерва при эндометриоидных кистах яичников. / К.А. Бугеренко, К.В. Ларин, А.Е. Бугеренко, Е.В. Проскурнина, О.Б. Панина // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.**- 2018. – Т. 17, № 4. - С. 25-30
19. Щербакова, Л.Н. Эффективность программы экстракорпорального оплодотворения при бесплодии, обусловленном наружным генитальным эндометриозом. / Д.А. Кочурина, А.Е. Бугеренко, О.Б. Панина // **Проблемы репродукции.** – 2019. – Т. 25, № 4. - С. 77-83
20. Щербакова, Л.Н. Клетки гранулезы как источники активных форм кислорода. / М.А. Шестакова, Е.В. Проскурнина, О.Б. Панина // **Акушерство и гинекология.** – 2019. - № 1. - С. 42-49
21. Щербакова, Л.Н. Течение беременности и родов у пациенток с эндометриодными кистами. / А.А. Калашник // Материалы XIII Международного конгресса по репродуктивной медицине – 2019. - С. 250-251
22. Щербакова, Л.Н. Содержимое эндометриоидной кисты как источник окислительного стресса в яичниках при эндометриозе. / Е.В. Проскурнина, Ю.А. Гарькавый, О.Б. Панина // Материалы первого национального конгресса с международным участием ЛАБРИН – 2019. - С. 66-67
23. Щербакова, Л.Н. Системный и локальный окислительный стресс при эндометриозе / Е.В. Проскурнина, А.О. Бернер, О.А. Маслова, О.Б. Панина // Материалы XXXII

Международного конгресса «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» – 2019. - С. 32-33

24. Щербакова, Л.Н. Влияние антиоксидантных свойств фолликулярной жидкости на качество эмбриона при ЭКО / Е.В. Проскурнина Е.В., М.А. Шестакова, Д.А. Кочурина, О.Б. Панина // Материалы XXXII Международного конгресса «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» – 2019. - С. 103-104

Список сокращений

8-OHdG	8-гидрокси-2-дезоксигуанозина
AUC	площадь под ROC-кривой
а-ГнРГ	агонисты гонадотропин рилизинг-гормона
АМГ	антимюллеров гормон
ант-ГнРГ	антагонисты гонадотропин рилизинг-гормона
АФК	активные формы кислорода
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ДИ	доверительный интервал
ИЛ	интерлейкин
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид
НГЭ	наружный генитальный эндометриоз
НМГ	низкомолекулярные гепарины
ОШ	отношение шансов
ПЖ	перитонеальная жидкость
ПП	прегравидарная подготовка
РВ	репродуктивный возраст
СПКЯ	синдром поликистозных яичников
ТПБ	трубно-перитонеальное бесплодие
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХЛ	хемилюминесценция