

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ СНИЖЕННОМ ОВАРИАЛЬНОМ РЕЗЕРВЕ

А. А. Гависова¹✉, М. А. Шевцова¹, П. О. Львова¹, Д. А. Бирюкова¹, М. Х. Ибрагимова¹, А. В. Новоселова¹, М. Н. Юшина¹, В. В. Чаговец¹, В. Е. Франкевич^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Минздрава России, Томск, Россия

Сниженный овариальный резерв (СОР) является одной из актуальных проблем репродуктивной медицины и часто ассоциирован с бесплодием и уменьшением эффективности программ ЭКО. Изменение метаболизма аминокислот может играть роль в патогенезе СОР как проявление эпигенетических нарушений в процессах фолликуло- и оогенеза. Целью исследования было проанализировать изменения метаболических путей аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости и оценить их клиническое значение при СОР. В исследование вошли 115 женщин в возрасте 25–42 лет с бесплодием. Группы были сформированы в зависимости от овариального резерва и возраста. Выполнено исследование уровней аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на масс-спектрометре (ВЭЖХ-МС) и проведен биоинформатический анализ их метаболических путей. Обнаружено статистически значимое изменение путей биосинтеза фенилаланина, тирозина и триптофана (влияние = 0,5; $p = 0,026$), метаболизма аланина, аспартата и глутамата (влияние = 0,114; $p = 0,013$) и биосинтеза аргинина (влияние = 0,289; $p < 0,001$), играющих роль в процессах фолликуло-, оогенеза и эмбриогенеза. Обнаруженные различия в содержании аминокислот в различных биологических жидкостях позволили разработать модели логистической регрессии, подтверждающие СОР с вероятностью 88% по уровням аминокислот в фолликулярной жидкости (чувствительность — 88%, специфичность — 84%) и 82% по уровням в плазме крови (чувствительность — 65%, специфичность — 91%). Эти результаты могут быть использованы для дальнейших исследований патогенеза бесплодия при СОР и выбора наиболее оптимальной тактики диагностики и лечения.

Ключевые слова: аминокислотный профиль, метаболизм, метаболический путь, репродуктивный возраст, бесплодие, сниженный овариальный резерв, ЭКО, ВЭЖХ-МС

Вклад авторов: А. А. Гависова — дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание статьи, редактирование; М. А. Шевцова, Д. А. Бирюкова, П. О. Львова — дизайн исследования, сбор и обработка материала, обзор литературы, написание статьи, редактирование; А. В. Новоселова, М. Н. Юшина — разработка метода ЖХ-МС анализа аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости, обработка экспериментальных данных; М. Х. Ибрагимова — сбор материала, редактирование; В. В. Чаговец, В. Е. Франкевич — статистическая обработка материала, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП имени В. И. Кулакова» (протокол № 12 от 25 ноября 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алла Анатольевна Гависова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; gaviiala@ya.ru

Статья получена: 27.03.2024 **Статья принята к печати:** 22.04.2024 **Опубликована онлайн:** 30.04.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.016

AMINO ACID PROFILE IN DIMINISHED OVARIAN RESERVE

Gavisova AA¹✉, Shevtsova MA¹, Lvova PO¹, Biryukova DA¹, Ibragimova MH¹, Novoselova AV¹, Yushina MN¹, Chagovets VV¹, Frankevich VE^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Diminished ovarian reserve (DOR) represents a relevant issue of reproductive medicine that is often associated with infertility and reduced efficacy of IVF programs. The changes in amino acid metabolism can play a role in the DOR pathogenesis as manifestations of the folliculogenesis and oogenesis epigenetic alterations. The study was aimed to assess alterations of amino acid metabolic pathways in blood plasma and follicular fluid and estimate their clinical significance in DOR. A total of 115 infertile women aged 25–42 years were included in the study. Groups were formed based on the ovarian reserve and age. Amino acid levels in blood plasma and follicular fluid were assessed by high performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS); bioinformatics analysis of amino acid metabolic pathways was performed. We revealed significant changes in the phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (effect = 0.5; $p = 0.026$), alanine, aspartate and glutamate metabolism (effect = 0.114; $p = 0.013$), and arginine biosynthesis (effect = 0.289; $p < 0.001$) pathways playing a role in folliculogenesis, oogenesis, and embryogenesis. The detected differences in the amino acid levels in various body fluids made it possible to construct the logistic regression models confirming DOR with the 88% probability based on the amino acid levels in follicular fluid (sensitivity 88%, specificity 84%) and 82% probability based on plasma levels (sensitivity 65%, specificity 91%). The findings can be used for further research focused on the pathogenesis of infertility associated with DOR and for selection of the most optimal diagnostic and treatment tactics.

Keywords: amino acid profile, metabolism, metabolic pathway, childbearing age, infertility, diminished ovarian reserve, IVF, HPLC-MS

Author contribution: Gavisova AA — study design, data acquisition and processing, manuscript writing, editing; Shevtsova MA, Biryukova DA, Lvova PO — study design, data acquisition and processing, literature review, manuscript writing, editing; Novoselova AV, Yushina MN — developing the LC-MS method for analysis of amino acids in blood plasma and follicular fluid, experimental data processing; Ibragimova MH — data acquisition, editing; Chagovets VV, Frankevich VE — statistical data processing, editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 12 dated 25 November 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alla A. Gavisova
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; gaviiala@ya.ru

Received: 27.03.2024 **Accepted:** 22.04.2024 **Published online:** 30.04.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.016

Сниженный овариальный резерв (СОР) — одна из актуальных проблем репродуктивной медицины. Уменьшение числа антральных фолликулов (КАФ), снижение уровня антимюллерового гормона (АМГ) и повышение уровня базального фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови приводят к формированию бесплодия, бедного овариального ответа, ухудшению качества ооцитов, снижению процента фертилизации, частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО/ИКСИ) и увеличению частоты ранних репродуктивных потерь [1].

Метаболизм гормонов и аминокислот может отражать эпигенетические изменения процессов фолликуло- и оогенеза [2] и характеризуется изменением не только уровней отдельных метаболитов, но и их взаимодействий в виде сложных метаболических «сетей» [3]. Рассматривая суммарный вклад эндокринно-метаболических изменений крови и фолликулярной жидкости в клеточный метаболизм и их влияние на результаты программ ЭКО, возможно приоткрыть отдельные патогенетические механизмы формирования СОР, а также определить метаболиты, которые могут выступать в качестве потенциальных biomarkers оценки овариального резерва [4, 5].

В опубликованном нами ранее исследовании у женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом было обнаружено значимое снижение уровней аминокислот саркозина и триптофана в плазме крови и фенилаланина, триптофана, метионина, аспарагина, аргинина и лизина в фолликулярной жидкости, а также их взаимосвязь с показателями фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза в программе ЭКО [6].

Целью исследования было проанализировать изменения метаболических путей аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости, их взаимосвязь с возрастом, а также оценить их клиническое значение в патогенезе СОР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В проспективное обсервационное исследование были включены женщины репродуктивного возраста с бесплодием, обратившиеся в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России для проведения программы ЭКО.

Общая выборка составила 115 женщин, которые были стратифицированы на группы СОР (антимюллеров гормон (АМГ) < 1,2 нг/мл, число антральных фолликулов (КАФ) < 5) и нормального (АМГ ≥ 1,2 нг/мл, КАФ ≥ 5). Для уточнения роли возраста на аминокислотный профиль у женщин с бесплодием исследуемые группы были дополнительно стратифицированы по возрасту: до 35 и после 35 лет. Критерии включения в исследование: репродуктивный возраст 25–42 лет; отсутствие наступления беременности в течение не менее года регулярной половой жизни без контрацепции; добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: противопоказания к ВРТ; операции на яичниках в анамнезе; иммунодефицитные состояния; системные заболевания соединительной ткани и ревматические заболевания; онкологические заболевания любой этиологии; наличие хромосомных и генетических аномалий; использование донорских ооцитов или эмбрионов, суррогатного материнства.

Всем пациенткам было проведено обязательное обследование перед вступлением в программу вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) согласно нормативным документам [7]. Для определения

содержания аминокислот и их метаболитов в плазме крови и фолликулярной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на масс-спектрометре (ВЭЖХ-МС) использовали жидкостной хроматограф Agilent 1260 II (Agilent; США) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6460 (Agilent; США). Параметры масс-спектрометра и хроматографического разделения соответствовали рекомендациям, приведенным в руководстве JASEM по анализу аминокислот (JASEM; Турция).

Перед статистической обработкой ВЭЖХ-МС данные нормировали на суммарный сигнал всех аналитов и приводили к стандартизованному виду согласно следующей формуле [9]:

$$z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\text{stddev}(x)}$$

где z_i — стандартизованное значение параметра, x_i — исходное значение параметра, \bar{x} — среднее значение параметра, $\text{stddev}(x)$ — стандартное отклонение совокупности.

Поиск метаболических путей, потенциально вовлеченных в патогенез СОР, выполняли с помощью MetaboAnalyst посредством анализа вовлеченности аминокислот, уровни которых значимо различаются между исследуемыми группами. Оценка обогащения метаболических путей была выполнена с помощью анализа избыточного представления (over representation analysis, ORA) с использованием гипергеометрического теста. Статистическую значимость метаболического пути определяли с использованием гипергеометрического теста с коррекцией по Бенджамини–Хохбергу. Статистическая значимость пути (p) соответствовала вероятности случайного пересечения экспериментальных данных с метаболитами конкретного метаболического пути (тест Фишера). Пути, ассоциированные с патологией, считали статистически значимыми при частоте ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) < 0,05.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основе аминокислотного профиля плазмы крови и фолликулярной жидкости были разработаны модели логистической регрессии. Для этого рассматривали все возможные комбинации аминокислот в качестве независимых переменных, а принадлежность пациентки к одной из групп — в качестве зависимой переменной. Качество моделей оценивали при помощи ROC-анализа, а также расчета чувствительности и специфичности. Из всех моделей выбирали четыре с наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели определяли критерий Уальда, 95%-й доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал.

Для статистической обработки данных ВЭЖХ-МС использовали скрипты, разработанные на языке R в программе RStudio [8]. Перед проведением целевого сравнительного метаболомного анализа данных в исследуемых группах определяли вид распределения данных (тест Колмогорова–Смирнова, графический анализ данных).

При нормальном виде распределения данных определяли среднее значение со стандартным отклонением M (SD), для оценки различий в группах — t -тест. При отсутствии нормального распределения данные были представлены в виде медианы с интерквартильным интервалом Me (Q_1 ; Q_3), сравнение уровней аминокислот проводили с помощью непараметрического критерия

Таблица 1. Клиническая характеристика женщин, включенных в исследование

Показатели	Группа 1 СОР (n = 50)***	Группа 2 НОР (n = 65)***	p*
Возраст, лет*	38,2 (6,18)	37,4 (4,6)	0,27
Возраст менархе, лет*	13,2 (1,2)	13,6 (1,4)	0,2
Длительность менструального цикла, дней*	27,5 (1,99)	28,8 (1,7)	0,002
КАФ*	4,6 (2,9)	13,0 (7,3)	< 0,001
АМГ, нг/мл**	0,65 (0,32; 0,92)	2,7 (1,9; 4,6)	< 0,001
ЛГ, мМЕ/мл**	5,8 (4,1–13,4)	4,1 (3,4–9,4)	0,2
ФСГ, мМЕ/мл**	8,3 (7,9–12,6)	6,5 (5,1–7,6)	0,1
ДГЭА-С, мкмоль/л**	3,8 (1,9; 5,4)	5,1 (4,1; 6,9)	0,14
Андростендион, нмоль/л**	4,5 (2,8; 7,8)	9,2 (7,9; 9,9)	0,09

Примечание: * — M (SD), t-тест; ** — тест Манна–Уитни; *** — медиана (интерквартильный интервал).

Уилкоксона–Манна–Уитни. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-anamnestическая и гормональная характеристики исследуемых представлена в табл. 1. Все пациентки были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям, имели регулярный менструальный цикл, средний возраст составил $37,2 \pm 5,3$ лет. Значимых различий по частоте гинекологической и соматической патологии выявлено не было. У пациенток с СОР был отмечен статистически значимо более короткий менструальный цикл, меньшее число антральных фолликулов и меньший уровень АМГ. При анализе эндокринного профиля отмечена тенденция к повышению уровня ФСГ и снижению уровней андрогенных стероидов: андростендиона и ДГЭА-С.

При исследовании аминокислотного профиля в группе СОР обнаружено значимое снижение уровней саркозина и триптофана в плазме крови и фенилаланина, триптофана, метионина, аспарагина, аргинина и лизина в фолликулярной жидкости. Подробные результаты анализа опубликованы ранее [6]. Был осуществлен анализ

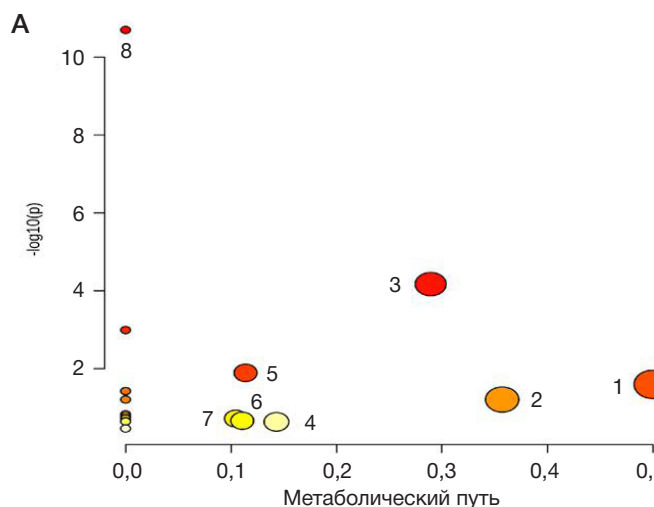
метаболических путей, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимо более низкими уровнями.

Изменения аминокислотного профиля плазмы крови и фолликулярной жидкости при бесплодии и СОР оказывают наибольшее влияние на биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана (влияние = 0,5, $p = 0,026$). Также выявлено значимое влияние на биосинтез аргинина (влияние = 0,289, $p < 0,001$), метаболизм аспартата (влияние = 0,25, $p = 0,027$), метаболизм аланина, аспартата и глутамата (влияние = 0,114, $p = 0,013$) (рис. 1; табл. 2).

По результатам ВЭЖХ-МС-анализа аминокислотного профиля были разработаны модели логистической регрессии, позволяющие различать образцы венозной плазмы и фолликулярной жидкости пациенток группы СОР и группы контроля. Для построения моделей использовали все возможные комбинации аминокислот. Для каждой из моделей выполнили ROC-анализ и выбрали четыре модели, характеризующиеся наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC).

Наибольшее значение AUC (0,82) было у модели, построенной на показателях возраста и уровнях серина, тирозина и фенилаланина. Специфичность и чувствительность составили 94 и 68% соответственно, пороговое значение — 0,69. Во все построенные модели

KEGG



SMPDB

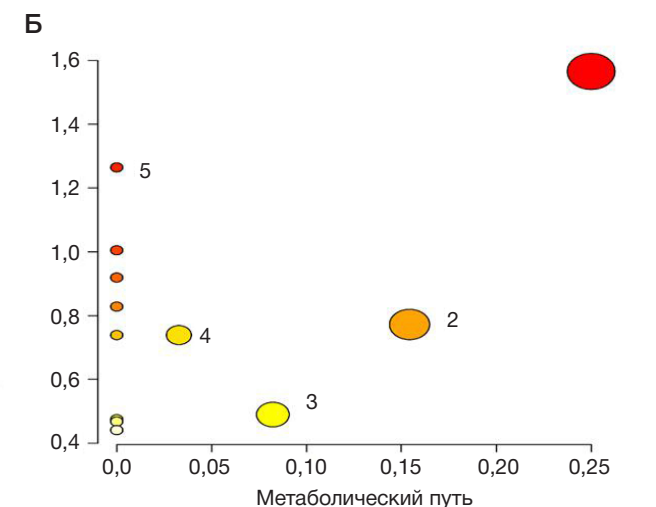


Рис. 1. Карта задействованности метаболических путей аминокислот со статистически значимыми различиями уровней в плазме крови и фолликулярной жидкости между группами (база данных KEGG, от англ. Kyoto encyclopedia of genes and genomes): 1 — биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана; 2 — метаболизм фенилаланина; 3 — биосинтез аргинина; 4 — метаболизм триптофана; 5 — метаболизм аланина, аспартата и глутамата; 6 — метаболизм аргинина и пролина; 7 — метаболизм цистеина и метионина; 8 — биосинтез аминокислот-тРНА. База данных SMPDB (от англ. small molecule pathway database): 1 — метаболизм аспартата; 2 — цикл мочевины; 3 — метаболизм аргинина и пролина; 4 — переработка аммиака; 5 — метаболизм биотина. Ось ординат и цвет узла отражают уровень статистической значимости вовлеченности выявленных аминокислот в соответствующие метаболические пути; ось абсцисс и радиус узла отражают уровень влияния рассматриваемых метаболитов на путь

Таблица 2. Вовлеченность в метаболические пути аминокислот, характеризующих SOP

Путь	Всего	Маркеры	p	FDR	Влияние
KEGG					
Биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана	4	1	0,026	0,0429	0,5
Метаболизм фенилаланина	10	1	0,063	0,5866	0,357
Биосинтез аргинина	14	3	< 0,001	0,0029	0,289
Метаболизм триптофана	41	1	0,236	1	0,143
Метаболизм аланина, аспартата и глутамата	28	2	0,013	0,0272	0,114
Метаболизм аргинина и пролина	38	1	0,22	1	0,111
Метаболизм цистеина и метионина	33	1	0,194	1	0,104
Биосинтез аминоксил-tRNA	48	8	< 0,001	1,68E-09	0
HMDB (Human metabolome database)					
Метаболизм аспартата	34	2	0,027	1	0,25
Цикл мочевины	23	1	0,169	1	0,154
Метаболизм аргинина и пролина	48	1	0,324	1	0,082
Метаболизм аммиака	25	1	0,18	1	0,033
Метаболизм биотина	7	1	0,054	1	0

Примечание: FDR (false discovery rate) — частота ложных обнаружений.

вошли значения возраста и уровня фенилаланина (рис. 2; табл. 3).

Для фолликулярной жидкости были также построены модели логистической регрессии аналогично описанном ранее. Все модели имели одинаковую площадь под кривой (AUC = 0,88). Модели 1 и 2 характеризовались большей чувствительностью (84%), а модели 3 и 4 — большей специфичностью (88%). Во все построенные модели вошел фенилаланин — очевидно, как аминокислота, содержание которой наиболее различалось между группами (рис. 2; табл. 3).

Для уточнения влияния возраста на аминокислотный профиль пациентки обеих групп были разбиты на две подгруппы: младше 35 и старше 35 лет. В группе SOP позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет) в плазме крови выявлено статистически значимое снижение уровней лизина, глутамина, серина, глицина, треонина, тирозина, лейцина, триптофана, глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также повышение пролина (рис. 3А). Однако в фолликулярной жидкости возраст-

ассоциированных изменений аминокислотного профиля при бесплодии и SOP с возрастом не выявлено (рис. 3Б). Также у женщин с нормальным овариальным резервом как в плазме крови, так и в фолликулярной жидкости не было выявлено значимых возраст-ассоциированных изменений аминокислотного профиля (рис. 3В, Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о значимых изменениях метаболизма аминокислот в патогенезе SOP. По нашим результатам, SOP характеризуется изменением биосинтеза фенилаланина, тирозина и триптофана — ароматических аминокислот, являющихся предшественниками нейротрансмиттеров, серотонина и катехоламинов (дофамина, норадреналина и адреналина), дефицит которых может привести к оксидативному стрессу, оказывающему токсическое влияние на процессы фолликуло- и оогенеза [10]. Фенилаланин играет значительную роль в формировании третичной структуры белка и стабилизации белковых структур [11].

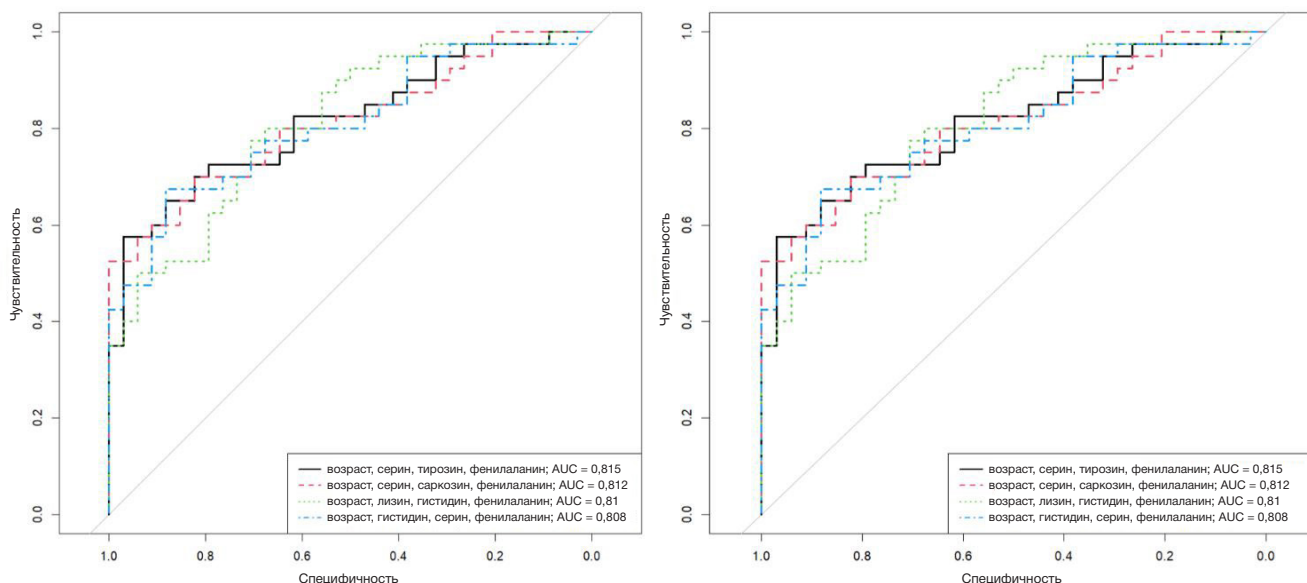


Рис. 2. Результаты ROC-анализа моделей логистической регрессии определения SOP по аминокислотному составу плазмы крови и фолликулярной жидкости

Таблица 3. Модели логистической регрессии, построенной по уровням аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости

Плазма крови				
Модель	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
Возраст, серин, тирозин, фенилаланин	0,82	0,69	0,68 (0,48; 0,88)	0,94 (0,68; 1)
Возраст, серин, саркозин, фенилаланин	0,81	0,75	0,65 (0,42; 0,85)	0,94 (0,71; 1)
Возраст, лизин, гистидин, фенилаланин	0,81	0,5	0,8 (0,45; 0,98)	0,76 (0,5; 1)
Возраст, гистидин, серин, фенилаланин	0,81	0,61	0,7 (0,48; 0,85)	0,88 (0,71; 1)
Фолликулярная жидкость				
Модель	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
Метилгистидин, серин, аланин, фенилаланин	0,88	0,45	0,88 (0,62; 0,97)	0,84 (0,69; 1)
Возраст, орнитин, серин, фенилаланин	0,88	0,47	0,88 (0,59; 0,97)	0,84 (0,69; 1)
Орнитин, серин, аланин, фенилаланин	0,88	0,55	0,84 (0,69; 0,97)	0,88 (0,69; 0,97)
Орнитин, серин, валин, фенилаланин	0,88	0,57	0,84 (0,66; 0,97)	0,88 (0,66; 1)

Сниженные уровни фенилаланина у женщин с СОР в нашем исследовании согласуются с результатами других авторов [12]. Роль фенилаланина в патогенезе СОР также подтверждается в нашем исследовании включением фенилаланина во все модели логистической регрессии с наибольшей значимостью.

При снижении уровня фенилаланина, являющегося основным субстратом синтеза тирозина в организме, снижается его доступность для производства тирозина [13], который служит основой для синтеза медиаторов и гормонов аминной природы: катехоламинов, серотонина, мелатонина. Все метаболиты тирозина способствуют правильной и последовательной работе всех систем организма для обеспечения репродуктивной функции. Тирозин, как и его предшественник, необходим для синтеза структуры бензохинона, которая входит в состав кофермента Q10 — антиоксиданта, обладающего способностью нейтрализовать свободные радикалы, ингибировать перекисное окисление липидов в биологических мембранах и защищать митохондриальные белки и ДНК от окислительного повреждения, а также участвующего в синтезе АТФ в митохондриях в качестве переносчика электронов [14]. Описана также антиоксидантная способность тирозина в исследовании семенной плазмы [15].

Участие триптофана неопределимо во многих физиологических процессах, например, при поддержании роста клеток и регуляции иммунной функции, а также в синтезе серотонина и мелатонина, снижение которых приводит к нарушению этапов раннего эмбрионального развития [16].

В нашем исследовании у женщин с СОР позднего репродуктивного возраста снижение уровней тирозина и триптофана коррелирует с ухудшением результатов программ ЭКО, что подтверждает их роль в возрастных изменениях оогенеза и раннего эмбрионального развития и согласуется с данными зарубежных коллег [17].

Биосинтез аргинина, значимое изменение которого выявлено в нашем исследовании, играет решающее значение для синтеза оксида азота (NO). Последний является фактором релаксации сосудов, оптимизирующим кровоснабжение тканей [18] и способствующим нормальному росту эндометрия [19], регуляции стероидогенеза и фолликулогенеза [20]. Применение препаратов с высоким содержанием аргинина при бедном овариальном ответе в программе ЭКО приводит к повышению уровней аргинина, цитруллина и NO в плазме

крови и фолликулярной жидкости и ассоциировано с улучшением маточного и яичникового кровоснабжения, увеличением частоты оплодотворения и наступления беременности и снижением частоты осложнений беременности (ранних репродуктивных потерь, задержки внутриутробного развития и преэклампсии) [21].

Анализ вовлеченности аминокислот в метаболические пути продемонстрировал статистически значимое изменение метаболизма аланина, аспартата и глутамата. Аспартат и глутамат являются возбуждающими медиаторами ЦНС, участвуя в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Аспартат, по данным нашего исследования, присутствует в более высоких концентрациях в фолликулярной жидкости у женщин раннего репродуктивного возраста, по сравнению с женщинами позднего репродуктивного возраста, что также подтверждено в одном из исследований наличием прямой корреляционной взаимосвязи уровня D-аспарагиновой кислоты в фолликулярной жидкости с морфологией ооцитов, их созреванием, процентом зрелых ооцитов и скоростью оплодотворения [22]. Из аспарагиновой кислоты образуется метионин, участвующий в синтезе полиаминов, посттрансляционной модификации белков и регуляции процессов считывания ДНК. В эксперименте на животных ограничение пищевого потребления метионина снижало в плазме крови уровни инсулиноподобного фактора роста 1, тиреоидных гормонов и снижало фертильность [23].

В нашем исследовании отмечен высокий прогностический потенциал фолликулярной жидкости у женщин с СОР наравне с плазмой крови, что согласуется с результатами других исследований, подтверждающими роль метаболизма аминокислот в фолликулярной жидкости как функционального показателя качества ооцитов у женщин позднего репродуктивного возраста в программах ЭКО/ИКСИ [24]. Вероятное снижение доступности аминокислот в фолликулярной жидкости может приводить к увеличению их потребления ооцитами в культуральной среде в программе ЭКО.

Важная роль антиоксидантной системы в ооцитах и связанный с возрастными изменениями дисбаланс между прооксидантной активностью и системами антиоксидантной защиты в ооцитах [25] провоцируют развитие митохондриальной дисфункции, способствуют увеличению частоты анеуплоидии ооцитов/эмбрионов и снижению частоты наступления беременности [26]. Полученные нами данные о выраженных изменениях аминокислотного профиля при СОР у женщин позднего

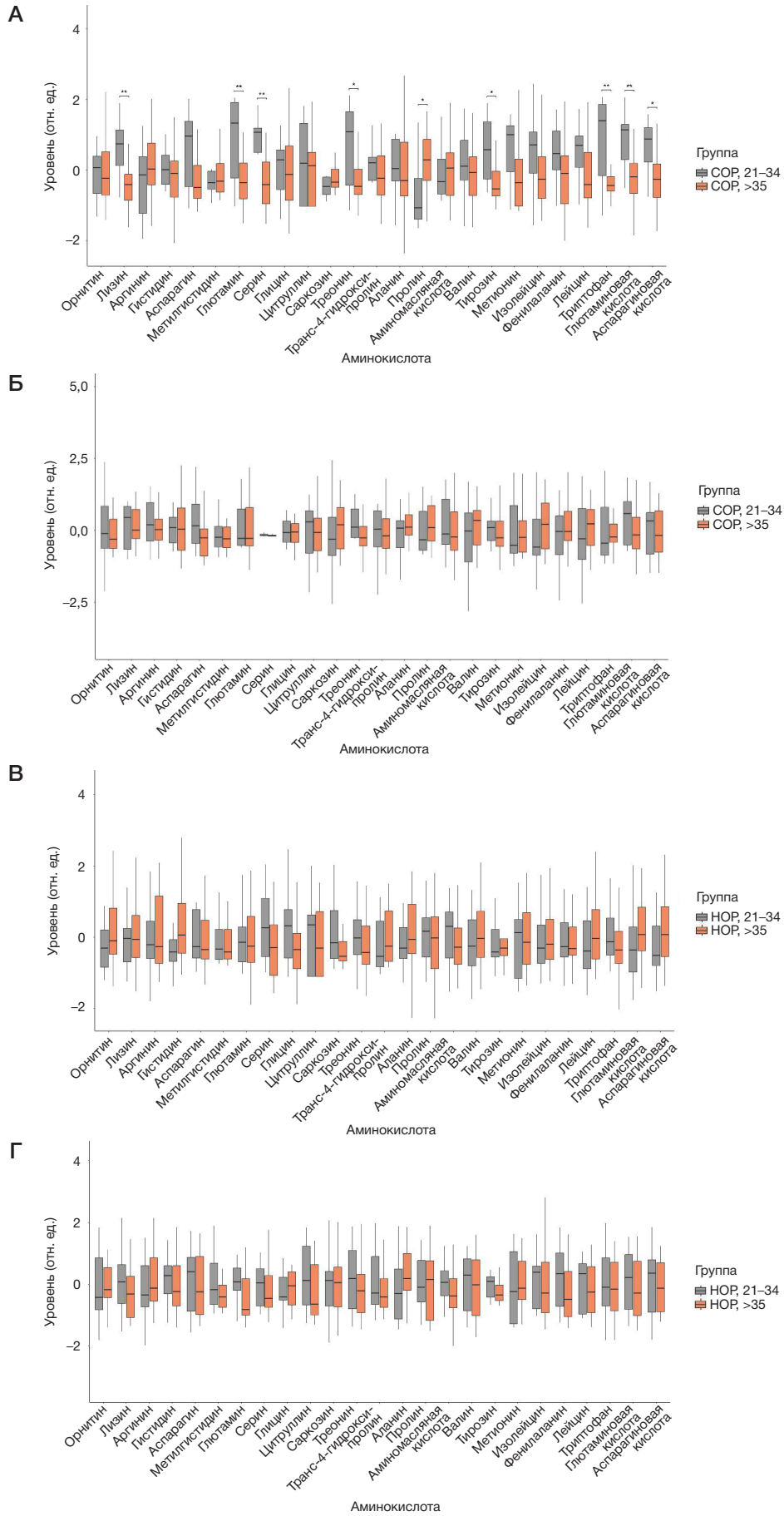


Рис. 3. Сравнение аминокислотного профиля плазмы крови (А, В) и фолликулярной жидкости (Б, Г) групп COP 21–34, COP >35 (А, Б), HOP 21–34 и HOP >35 (В, Г)

репродуктивного возраста подтверждают общее снижение обмена аминокислот с возрастом, связанное в том числе со снижением их антиоксидантной способности, и могут быть использованы для оценки овариального резерва. Актуальным остается дальнейшее исследование применения аминокислот в клинической практике для улучшения исходов программ ЭКО/ИКСИ как *in vitro*, при их добавлении в эмбриологические среды, так и *in vivo*, при приеме препаратов с высоким содержанием необходимых аминокислот [27, 28].

ВЫВОДЫ

Значимое изменение метаболизма аминокислот в плазме крови и фолликулярной жидкости при бесплодии и СОР,

в том числе фенилаланина, тирозина и триптофана, задействованных в реализации антиоксидантной защиты в тканях яичника, синтезе нейромедиаторов, катехоламинов и гормонов, оказывает непосредственное влияние на репродуктивную систему, изменяя клеточный энергетический метаболизм. На основании найденных различий при использовании методов целевой полуколичественной метаболомики были предложены модели, позволяющие с вероятностью 82% в плазме крови и 88% — в фолликулярной жидкости подтвердить СОР по аминокислотному профилю. Данные о возраст-ассоциированном изменении уровней аминокислот при СОР подтверждают актуальность исследований применения предварительной терапии препаратами, содержащими аминокислоты с целью улучшения исходов программ ЭКО.

Литература

- Hu S. Perinatal outcome in young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive technology / S. Hu, B. Xu, L. Jin // *Fertility and Sterility*. 2020; 114 (1): 118–124.e1.
- Collado-Fernandez E, Picton HM, R. Dumollard Collado-Fernandez E. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *The International Journal of Developmental Biology*. 2012; 56 (10-11-12): 799–808.
- Dillin A, Gottschling DE, T. Nyström Dillin A. The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Current Opinion in Cell Biology*. 2014; 26: 107–12.
- Yang J, Feng T, Li S, et al. Human follicular fluid shows diverse metabolic profiles at different follicle developmental stages. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18 (1): 74.
- Moslehi N, Mirmiran P, Marzbani R. et al. Serum metabolomics study of women with different annual decline rates of anti-Müllerian hormone: an untargeted gas chromatography–mass spectrometry-based study. *Human Reproduction*. 2021; 36 (3): 721–33.
- Shevtsova SMA, Gavisova GAA, Krasnova KNA, et al. Amino acid profile of blood plasma and follicular fluid in women with infertility and diminished ovarian reserve. *Akusherstvo i ginekologija*. 2024; 2 (2024): 79–88.
- Клинические рекомендации «Женское бесплодие». 2021.
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA; 2016. Available from: <http://www.rstudio.com/>.
- Misra BB. Data normalization strategies in metabolomics: Current challenges, approaches, and tools. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2020; 26 (3): 165–74.
- Zhang X, Yoshihara K, Miyata N, et al. Dietary tryptophan, tyrosine, and phenylalanine depletion induce reduced food intake and behavioral alterations in mice. *Physiology & Behavior*. 2022; 244: 113653.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007; 115 (10): 1285–95.
- Li J, Zhang Z, Wei Y, et al. Metabonomic analysis of follicular fluid in patients with diminished ovarian reserve. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; 14. DOI: 10.3389/fendo.2023.1132621.
- Ross AC, Caballero BH, Cousins RJ, et al. *Modern nutrition in health and disease*: Eleventh edition. Wolters Kluwer Health Adis (ESP). 2012; 1616 p.
- Rasmussen DD, Ishizuka B, Quigley ME, Yen SSC. Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1983; 57 (4): 760–3.
- van Overveld F. W. P. C., Haenen G. R. M. M., Rhemrev J, et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions*. 2000; 127 (2): 151–61.
- Dubé F, Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*. 2007; 81 (25–26): 1627–37.
- Liu A, Shen H, Li Q, et al. Determination of tryptophan and its indole metabolites in follicular fluid of women with diminished ovarian reserve. *Scientific Reports*. 2023; 13 (1): 17124.
- DuPont JJ, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG. Ascorbic acid or *l*-arginine improves cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *Journal of Applied Physiology*. 2011; 111 (6): 1561–7.
- Takasaki A, Tamura H, Miwa I, et al. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertility and Sterility*. 2010; 93 (6): 1851–8.
- Luo Y, Zhu Y, Basang W, et al. Roles of nitric oxide in the regulation of reproduction: a review. *Frontiers in Endocrinology*. 2021; 12.
- Kopets R, Kuibida I, Chernyavska I, et al. Dietary supplementation with a novel *l*-carnitine multi-micronutrient in idiopathic male subfertility involving oligo-, astheno-, teratozoospermia: a randomized clinical study. *Andrology*. 2020; 8 (5): 1184–93.
- D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, et al. Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Human Reproduction*. 2007; 22 (12): 3178–83.
- Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice. Rountree CB, Senadheera S, Mato JM, et al. *Hepatology*. 2007; 47 (4): 1288–97.
- Akamine K, Mekaru K, Gibo K, et al. Impact of the one-carbon metabolism on oocyte maturation, fertilization, embryo quality, and subsequent pregnancy. *Reproductive Medicine and Biology*. 2021; 20 (1): 76–82.
- Tatone C, Amicarelli F. The aging ovary — the poor granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2013; 99 (1): 12–17.
- Chappel S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013; 2013: 1–10.
- Youssef M. A. F. M., Abdelmoty HI, Elashmwi HA, et al. Oral antioxidants supplementation for women with unexplained infertility undergoing ICSI/IVF: Randomized controlled trial. *Human Fertility*. 2015; 18 (1): 38–42.
- Anchordoquy JP, Lizarraga RM, Anchordoquy JM, et al. Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to *in vitro* fertilization medium during bovine early embryo development. *Reproductive Biology*. 2019; 19 (4): 349–55.

References

- Hu S. Perinatal outcome in young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive technology // S. Hu, B. Xu, L. Jin // *Fertility and Sterility*. 2020; 114 (1): 118–124.e1.
- Collado-Fernandez E, Picton HM, R. Dumollard Collado-Fernandez E. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *The International Journal of Developmental Biology*. 2012; 56 (10-11-12): 799–808.
- Dillin A, Gottschling DE, T. Nyström Dillin A. The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Current Opinion in Cell Biology*. 2014; 26: 107–12.
- Yang J, Feng T, Li S, et al. Human follicular fluid shows diverse metabolic profiles at different follicle developmental stages. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18 (1): 74.
- Moslehi N, Mirmiran P, Marzbani R. et al. Serum metabolomics study of women with different annual decline rates of anti-Müllerian hormone: an untargeted gas chromatography–mass spectrometry-based study. *Human Reproduction*. 2021; 36 (3): 721–33.
- Shevtsova SMA, Gavisova GAA, Krasnova KNA, et al. Amino acid profile of blood plasma and follicular fluid in women with infertility and diminished ovarian reserve. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2024; 2 (2024): 79–88.
- Klinicheskie rekomendacii "Zhenskoe besplodie". 2021.
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA; 2016. Available from: <http://www.rstudio.com/>.
- Misra BB. Data normalization strategies in metabolomics: Current challenges, approaches, and tools. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2020; 26 (3): 165–74.
- Zhang X, Yoshihara K, Miyata N, et al. Dietary tryptophan, tyrosine, and phenylalanine depletion induce reduced food intake and behavioral alterations in mice. *Physiology & Behavior*. 2022; 244: 113653.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007; 115 (10): 1285–95.
- Li J, Zhang Z, Wei Y, et al. Metabonomic analysis of follicular fluid in patients with diminished ovarian reserve. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; 14. DOI: 10.3389/fendo.2023.1132621.
- Ross AC, Caballero BH, Cousins RJ, et al. *Modern nutrition in health and disease: Eleventh edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP). 2012; 1616 p.
- Rasmussen DD, Ishizuka B, Quigley ME, Yen SSC. Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1983; 57 (4): 760–3.
- van Overveld F. W. P. C., Haenen G. R. M. M., Rhemrev J, et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions*. 2000; 127 (2): 151–61.
- Dubé F, Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*. 2007; 81 (25–26): 1627–37.
- Liu A, Shen H, Li Q, et al. Determination of tryptophan and its indole metabolites in follicular fluid of women with diminished ovarian reserve. *Scientific Reports*. 2023; 13 (1): 17124.
- DuPont JJ, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG. Ascorbic acid or L-arginine improves cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *Journal of Applied Physiology*. 2011; 111 (6): 1561–7.
- Takasaki A, Tamura H, Miwa I, et al. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertility and Sterility*. 2010; 93 (6): 1851–8.
- Luo Y, Zhu Y, Basang W, et al. Roles of nitric oxide in the regulation of reproduction: a review. *Frontiers in Endocrinology*. 2021; 12.
- Kopets R, Kuibida I, Chernyavska I, et al. Dietary supplementation with a novel L-carnitine multi-micronutrient in idiopathic male subfertility involving oligo-, astheno-, teratozoospermia: a randomized clinical study. *Andrology*. 2020; 8 (5): 1184–93.
- D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, et al. Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Human Reproduction*. 2007; 22 (12): 3178–83.
- Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice. Rountree CB, Senadheera S, Mato JM, et al. *Hepatology*. 2007; 47 (4): 1288–97.
- Akamine K, Mekaru K, Gibo K, et al. Impact of the one-carbon metabolism on oocyte maturation, fertilization, embryo quality, and subsequent pregnancy. *Reproductive Medicine and Biology*. 2021; 20 (1): 76–82.
- Tatone C, Amicarelli F. The aging ovary — the poor granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2013; 99 (1): 12–17.
- Chappel S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013; 2013: 1–10.
- Youssef M. A. F. M., Abdelmoty HI, Elashmwi HA, et al. Oral antioxidants supplementation for women with unexplained infertility undergoing ICSI/IVF: Randomized controlled trial. *Human Fertility*. 2015; 18 (1): 38–42.
- Anchordoquy JP, Lizarraga RM, Anchordoquy JM, et al. Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to in vitro fertilization medium during bovine early embryo development. *Reproductive Biology*. 2019; 19 (4): 349–55.