

Investigation of targeted metabolites and organic acids resulting from cellular metabolism in the culture medium of cells extracted from endometriosis tissue using the GC/MS technique: a metabolomics approach

Ali Mohebbi¹, Vida Hojati^{2*}, Reza Aflatoonian³, Masoumeh Majidi Zolbin^{4**}

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

2. Associate Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

3. Department of Endocrinology and Female Infertility at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

4. Iranian tissue bank and research center, Tehran University of medical sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Endometriosis, a chronic inflammatory gynecological disorder, features ectopic endometrial-like glands and stroma, impacting ~10% of reproductive-age women and causing substantial morbidity. Limited insights into its pathogenesis prompted this metabolomics-based investigation to delineate metabolic perturbations in ectopic tissues under controlled physiological conditions, minimizing confounders.

Materials and Methods: Ectopic endometrial tissues from endometriosis patients were procured laparoscopically, while eutopic endometrial tissues from controls were sampled via aspiration during the proliferative menstrual phase. Post-collagenase digestion, 200,000 cells/well were cultured to confluence; media were then static for 72 h. Secreted metabolites were extracted and profiled using Shimadzu's organic acid diagnostic panel on a GC/MS system.

Results: Twenty-four metabolites were quantified. Ectopic samples exhibited significant reductions in fumaric acid and 2-ketoglutarate ($P<0.05$), alongside elevations in 4-hydroxyphenyllactic acid, palmitic acid, and lactate ($P<0.05$). Pyruvate, citrate, and 2-hydroxyisovalerate were nominally higher, albeit non-significantly. Pathway enrichment revealed disruptions in arginine biosynthesis, pyruvate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and fatty acid pathways (including unsaturated fatty acid synthesis, β -oxidation, elongation, and GPI-anchor biosynthesis).

Conclusion: Krebs cycle dysregulation, coupled with upregulated inflammatory/oxidative stress metabolites, likely promotes ectopic cell survival and immune evasion. These metabolomic signatures underscore potential biomarkers for early endometriosis diagnosis and novel therapeutic targets.

Keywords: Metabolomics, Endometriosis, Organic acids, GC/MS.

*Corresponding author:

Vida Hojati Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Email: vida.hojati@iau.ac.ir

Masoumeh Majidi Zolbin²; Tehran, End of Keshavarz Boulevard, Imam Khomeini Hospital Complex, Research Center of the Bank of Transplantation

Email: Masoumeh.majidizolbin@gmail.com

بررسی متابولیت‌های هدفمند و اسیدهای ارگانیک ناشی از متابولیسم سلولی در محیط کشت سلول‌های استخراج‌شده از بافت اندومتريوز با استفاده از تکنیک GC/MS:

رویکردی از منظر متابولومیکس

علی محبی^۱، ویدا حجتی^{۲*}، رضا افلاطونیان^۳، معصومه مجیدی ذوالبین^{۴**}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۳- دانشیار، گروه بیولوژی تولیدمثل زنان، پژوهشگاه رویان، تهران ایران

۴- استادیار علوم تشریح، مرکز تحقیقات بانک فراورده های پیوندی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ایران

چکیده

سابقه و هدف: اندومتريوز، اختلال التهابی مزمن زنانگی، با وجود غدد و استرومای شبیه اندومتر خارج از رحم مشخص می‌شود و حدود ۱۰٪ زنان در سن باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به نرخ ابتلای قابل توجهی می‌گردد. محدودیت دانش در مورد پاتوژن آن، این مطالعه متابولومیک را برای تبیین اختلالات متابولیک در بافت‌های اکتوپیک تحت شرایط فیزیولوژیک کنترل شده و با حداقل عوامل مخدوش کننده برانگیخت.

مواد و روش‌ها: بافت‌های اندومتريال اکتوپیک از بیماران اندومتريوز به روش لاپاروسکوپی تهیه شد، در حالی که بافت‌های اندومتريال یوتوپیک از گروه کنترل طی فاز پروليفراتیو سیکل قاعدگی با آسپیراسیون نمونه‌برداری گردید. پس از هضم با کلاژناز، ۲۰۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شد تا به همگرایی رسید؛ سپس محیط کشت برای ۷۲ ساعت استاتیک ماند. متابولیت‌های ترشح‌شده استخراج و با پنل تشخیصی اسیدهای آلی روی سیستم GC/MS ساخت کمپانی Shimadzu آنالیز شد.

یافته‌ها: بیست و چهار متابولیت کمی‌سازی شد. نمونه‌های اکتوپیک کاهش معنی‌دار اسید فوماریک و ۲-کتوگلوکوتارات ($P<0.05$) و افزایش ۴-هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک اسید، اسید پالمیتیک و لاکتات ($P<0.05$) نشان دادند. پیرووات، سترات و ۲-هیدروکسی‌ایزوالرات به طور اسمی بالاتر بودند، هرچند غیرمعنادار. غنی‌سازی مسیرها اختلالات در بیوسنتز آرژنین، متابولیسم پیرووات، گلیکولیز/گلوکونئوز و مسیرهای اسیدهای چرب (شامل سنتز اسیدهای چرب غیراشباع، β -اکسیداسیون، الونگاسیون و بیوسنتز لنگر (GPI) را آشکار کرد.

نتیجه‌گیری: اختلال تنظیم در چرخه کربس، همراه با متابولیت‌های التهابی/استرس اکسیداتیو بالا، احتمالاً بقای سلول‌های اکتوپیک و فرار ایمنی را تسهیل می‌کند. این سیگنال‌های متابولومیک، نشانگرهای زیستی بالقوه برای تشخیص زودهنگام اندومتريوز و اهداف درمانی نوین را برجسته می‌سازد.

واژگان کلیدی: متابولومیک، اندومتريوز، اسیدهای آلی، GC/MS.

نویسنده مسئول: *گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

**تهران، انتهای بلوار کشاورز، مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)، مرکز تحقیقات بانک فراورده های پیوندی

- پست الکترونیکی: v.vida.hojati@iau.ac.ir, Masoumeh.majidizolbin@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

۱- مقدمه

آندومتریوز یک بیماری مزمن در زنان است که با وجود بافتی از جنس اپیتلیوم و یا آسترومای آندومتر در خارج از آندومتر و معمولاً با یک فرایند التهابی همراه مشخص می‌شود (۱). این بیماری یک وضعیت مزمن عصبی و التهابی با درد مزمن لگنی ناتوان‌کننده است که حدود ۶ تا ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری و تا ۵۰ درصد در زنان نابارور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). اگرچه برخی از زنان بدون علامت هستند، اما آن‌هایی که این علائم مزمن را تجربه می‌کنند اغلب از مشکلات عاطفی و کاهش کیفیت زندگی، با سطوح بالایی از استرس، اضطراب و افسردگی رنج می‌برند؛ بنابراین، ابتلا به این بیماری ممکن است چرخه‌ای از مشکلات عاطفی ایجاد کند که علائم را به‌طور مداوم بدتر می‌کند (۳). طبق یک نظریه کلاسیک، قاعدگی رتروگرد یعنی خروج قطعه‌های بافت، سلول‌ها و خون از طریق لوله‌های فالوپ، معادل یک دانه است که در خاک دیواره صفاق رشد می‌کند و باعث ایجاد آندومتریوز می‌شود (۴). سلول‌های آزادشده از آندومتر در طی قاعدگی شامل سلول‌های اپیتلیال (غدد و مجرا)، فیبروبلاست‌های استرومایی/سلول‌های دسیدوال، سلول‌های عروقی (پیرواسکولار و اندوتلیال) و جمعیت متنوعی از سلول‌های ایمنی (به‌ویژه نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها/ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی) رحم هستند (۵، ۶). تمام این انواع سلولی، پتانسیل ایجاد ضایعات صفاقی را دارند به شرط آن‌که بتوانند زنده بمانند و از نظارت سیستم ایمنی در حفره صفاقی فرار کنند. آندومتریوز ویژگی‌های مشابه سرطان را نشان می‌دهد و هم آندومتریوز و هم سرطان را می‌توان به‌عنوان اختلال‌های متابولیکی در نظر گرفت (۷).

انقلاب omics منجر به ظهور متابولومیکس، حوزه‌ای است که به تسریع درک ویژگی‌های کلی متابولیک، شناسایی نشانگرهای زیستی و روشن‌سازی مکانیسم‌های متابولیکی کمک می‌کند (۸). متابولومیکس به اندازه‌گیری ترکیب‌ها یا متابولیت‌های با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱/۵ کیلودالتون) در یک نمونه بیولوژیکی پرداخته و مجموع این متابولیت‌ها را متابولوم تشکیل می‌دهد. برآورد می‌شود که متابولوم انسان شامل حدود ۴۲۰۰۰ متابولیت باشد که سطح هر کدام از آن‌ها به

وضعیت فیزیولوژیکی، تکاملی و پاتولوژیک خاص سلول یا بافت وابسته است. این پدیده، بیانگر تأثیرهای ژنتیکی و محیطی بر فنوتیپ‌های سلولی یا بافتی است (۹). متابولومیکس به‌عنوان ابزاری کارآمد و قابل اعتماد برای شناسایی متابولیت‌ها و بیومارکرها در سیستم‌های بیولوژیکی تحت شرایط مختلف، اطلاعات مهمی درباره وضعیت فیزیولوژیکی یک بافت یا سیال زیستی فراهم می‌آورد. متابولیت‌ها نه تنها محصولات نهایی فرایندهای تنظیم‌کننده بیولوژیکی اند، بلکه ارتباطدهنده‌ای بین ژنوم و فنوتیپ عملکردی محسوب نیز می‌شوند (۱۰). در حوزه پزشکی، متابولومیکس دو هدف اصلی را پیگیری می‌کند: شناسایی متابولیت‌های غیرطبیعی و مسیرهای متابولیکی برای فرضیه‌سازی درباره علل بیماری و شناسایی بیومارکرها قابل اعتماد برای تشخیص زودهنگام بیماری یا پیش‌درمان. با شناسایی این نشانگرهای زیستی، تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیک به درک بهتر پاتوفیزیولوژی بیماری و ارتباط متابولیت‌های خاص با آن کمک می‌کند (۱۱). تکنیک‌های متابولومیکس به‌ویژه در شناسایی متابولیت‌های کلیدی در مسیرهای مرتبط با پاتوفیزیولوژی آندومتریوز کاربرد دارند (۱۲). این رویکرد به دلیل قابلیت نظارت بر پیشرفت بیماری و تمایز بین افراد بیمار و سالم از طریق روش‌های کم‌تهاجمی، به‌عنوان ابزاری بالقوه در تشخیص و درک پاتوفیزیولوژی بیماری موردتوجه قرار گرفته است (۱۳). در رویکرد متابولومیکس هدفمند، تمرکز بر اندازه‌گیری مجموعه‌ای از متابولیت‌هاست که براساس یک فرضیه مشخص، مسیر بیوشیمیایی معین یا وضعیت پاتولوژیک موردنظر انتخاب شده‌اند. در این روش، به‌جای پایش گسترده و بدون تعریف همه متابولیت‌های موجود در نمونه، تنها گروهی محدود از پیش تعیین‌شده موردسنجش قرار می‌گیرند. اندازه‌گیری این متابولیت‌ها معمولاً با استفاده از فناوری‌های دقیق و حساس نظیر LC-MS/MS یا GC-MS انجام می‌شود و امکان اندازه‌گیری کمی، معتبر و تکرارپذیر را فراهم می‌کند. در مجموع، هدف از متابولومیکس هدفمند، دستیابی به ارزیابی دقیق و قابل اعتماد از متابولیت‌هایی است که نقش کلیدی در پاسخ به سؤال بیولوژیک یا بالینی مطرح‌شده دارند. بررسی متابولیت‌ها و اسیدهای آلی حاصل از متابولیسم سلولی در محیط کشت، بدون تأثیر میکرومحیط و فیزیولوژی طبیعی بدن، می‌تواند اطلاعات

کشت سلول انجام شد و بخشی نیز برای بررسی هیستوپاتولوژی و تأیید پاتولوژی بافت اندومتریوز به محیط فرمالین انتقال داده شد. پس از تأیید بیماری در نهایت در ۲۰ نمونه بیمار اندومتریوزی و ۱۰ نمونه کنترل فرایند مطالعه ادامه یافت.

۲-۲- کشت سلول

برای نمونه، کشت سلول بخش کوچکی از بافت اندومتر یا بافت اندومتریوز به اندازه حدود ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر به زیر هود لامینار انتقال داده شد. پس از هموژن کردن بافت با تیغ بیستوری برای جداسازی بهتر سلول‌ها در محلول DMEM (DMEM/F12 1:1: Gibco, 32500-035) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم آنزیم کلاژناز در هر ۱ سی‌سی محلول در یک فالكون ۱۰ سی‌سی قرار گرفت. ابتدا ترکیب بافت و محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دست تکان داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و مجدداً ۱۰ دقیقه ورتکس شد. سپس سلول‌ها با استفاده از فیلتر مش ۷۰ میکرو فیلتر شدند. برای خنثی‌سازی اثر کلاژناز به اندازه محلول موجود در فالكون DMEM اضافه شد و پس از یک مرحله ورتکس، فالكون‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی تخلیه شد. برای اطمینان از شست‌وشوی سلول‌ها از آنزیم کلاژناز این مرحله دوبار تکرار شد. در نهایت پلیت سلولی انتهای فالكون با ۲ سی‌سی محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد، DMEM و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین ساخت کمپانی سیگما) ورتکس شد و پس از جدا شدن کامل پلاک تعداد ۲۰۰۰۰ سلول به پلیت کشت سلول ۲۴ خانه انتقال داده شد و سپس به انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و CO₂ برابر ۵ درصد منتقل شد. پس از آنکه رشد سلول‌ها در محیط کشت به حدود ۸۰ درصد رسید، محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت تعویض نشد و پس از آن محلول محیط کشت برای آنالیز متابولومیک برداشته شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد (۱۵).

ارزشمندی درباره بروز، پیشرفت یا بهبود بیماری ارائه دهد. بنابراین، در این مطالعه به بررسی ارگانیک اسیدها و متابولیسم آن‌ها در محیط کشت سلول‌های اولیه اندومتریوز نسبت به گروه کنترل پرداخته شد.

رایج‌ترین تکنیک‌های تحلیلی در مطالعه‌های متابولومیک شامل NMR و طیف‌سنجی جرمی (MS) هستند (۱۴) درحالی‌که MS به آماده‌سازی بافت نیاز دارد و معمولاً با تکنیک‌های جداسازی مانند کروماتوگرافی مایع (LC) یا کروماتوگرافی گازی (GC) همراه است، حساسیت بیشتری نسبت به NMR ارائه می‌دهد (۱۱). بر این اساس، در این مطالعه از روش GC/MS برای آنالیز استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

این مطالعه پس از تأیید در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1398.406 آغاز شد. نمونه‌گیری این مطالعه براساس تصادفی آسان صورت گرفته است. بیماران از بازه سنی ۱۸ تا ۴۰ سال انتخاب شدند. در مجموع برای اجرای پروژه ۲۳ بیمار با احتمال ابتلا به بیماری اندومتریوز و ۱۲ بیمار به‌عنوان گروه کنترل وارد این مطالعه شدند. پس از توضیح دادن در مورد علت اجرای طرح و اخذ رضایت‌نامه، ابتدا از بیماران شرح حال گرفته شد. پس از اعمال معیارهای ورود و خروج، بیمارانی با سابقه یک اختلال عفونی و التهابی در حفره شکمی یا سابقه دریافت فراورده‌های خونی یا تغذیه وریدی از مطالعه حذف شدند. زنان بدون سابقه ابتلا به اندومتریوز و بیماری التهابی دستگاه تناسلی و دارای فرزند (عدم ناباروری) که جهت انجام جراحی‌های الکتیو از جمله میوم، فیبروم، درموئید، کیست تخمدان، آدنومیوزیس و لیومیوم مراجعه کرده بودند به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. نمونه‌گیری از هر دو گروه بیمار و کنترل در فاز پرولیفراتیو چرخه قاعدگی گرفته شد. نمونه‌های اندومتر کنترل به‌وسیله پاپیل از طریق واژینال تهیه و نمونه اکتوپیک به‌وسیله بیوپسی با لاپاراسکوپي گرفته شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از چند مرحله شست‌وشو با نرمال سالین برای پاک شدن از خون و خونابه، بخشی از نمونه‌ها برای کشت به اتاق کشت انتقال یافته و بلافاصله

گرا د و تحت فشار گاز نیتروژن به طور کامل خشک شدند. پس از خشک شدن $100\mu\text{L}$ $\text{BSTFA} + 1\% \text{ TMCS}$ ساخت شرکت ترموفیشر به نمونه خشک شده اضافه شد پس از ورتکس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. نمونه‌ها به درون میکرواینزرت انتقال داده شدند و در درون ویال ۱/۵ میلی لیتر قرار گرفتند. در این مرحله نمونه آماده تزریق به دستگاه GC/MS بود. برای تزریق به دستگاه یک میکرولیتر از نمونه مورد نیاز بود تا ظرف مدت ۶۰ دقیقه خوانش انجام شده و پروفایل ارگانیک اسیدها مورد بررسی قرار گیرد. برای این آنالیز از ستون DB-5 (5% phenyl / 95% dimethyl polysiloxane) با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر بر روی دستگاه GC/Mass ساخت کمپانی شیمادزو مدل Q20-20 استفاده شد. در این مطالعه تعداد ۱۱۶ متابولیت (طبق فایل پیوست ۱) که توسط کمپانی سازنده دستگاه به عنوان پنل تشخیصی برای بررسی اختلالات متابولیک و اختلالات ارگانیک اسید ستاپ شده به روش SIM مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۴- روش آنالیز داده‌ها

پس از خوانش نمونه‌ها در نهایت سطح زیر پیک هریک از متابولیت‌ها با استفاده از نرم افزار GC/MS Solution اندازه گیری شده و خروجی به صورت یک فایل اکسل در اختیار قرار گرفت. ابتدا مقدار سطح زیر پیک ۳ استاندارد شامل مارگاریک اسید، تتراکوزان و تروپیک اسید جهت کنترل کیفی مورد بررسی قرار گرفت. برای استاندارد سازی تمام نمونه‌ها، مقدار سطح زیر پیک هر متابولیت بر مقدار مارگاریک اسید تقسیم شده و ضرب در صد شد. برای آنالیز داده‌ها از وبسایت متابوآنالیز ورن ۶ استفاده شد که آنالیز داده‌ها را براساس نرم افزارهای R و پایتون انجام می دهد. در این مطالعه براساس دو گروهی که مورد مطالعه قرار گرفتند نمونه‌های محیط کشت حاصل از کشت گروه کنترل (گروه صفر) و محیط کشت حاصل از کشت بافت‌های اکتوپیک (گروه یک) گدبندی شدند. پس از وارد کردن

۲-۳- آماده سازی نمونه جهت تزریق به دستگاه

GC/Mass برای بررسی متابولیت‌ها و ارگانیک اسیدها

پس از کشت سلول‌ها و حذف نمونه‌های مشکوک به آلودگی یا سلول‌هایی که رشد کافی نداشتند در نهایت ۱۹ نمونه برای گروه اندومتر اکتوپیک و ۹ نمونه به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. موقع بررسی متابولیک برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از هر محیط کشت دو نمونه مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت میانگین هر دو، مورد آنالیز قرار گرفت. روش انجام کار مورد استفاده براساس روش تنظیم شده توسط کمپانی سازنده دستگاه GC/Mass شیمادزو و با نرم افزارهای اختصاصی مربوطه انجام شد. برای انجام آزمایش نمونه‌ها درون بلوک حرارتی با دمای ۳۷ درجه سانتی - گراد قرار گرفتند تا کاملاً ذوب شوند و سپس در دور ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از محلول رویی برای انجام آزمایش استفاده شد. در مرحله بعدی حجم ۱۹۰۰ میکرولیتر نمونه به دست آمده به درون لوله ۱۰ میلی لیتری انتقال یافت. سپس ۵۰ میکرولیتر تروپیک اسید و ۵۰ میکرولیتر ترکیب مارگاریک اسید و تتراکوزان با غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر به عنوان استاندارد داخلی به نمونه اضافه شد. ۰/۵ میلی لیتر از محلول هیدروکسیل آمونیوم کلرید ۵ درصد و ۴۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۲/۵N به نمونه اضافه شد و بعد از ورتکس، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به ترتیب ۳۵۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۶N و ۶ میلی لیتر از اتیل استات به نمونه اضافه و ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس در دور ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه بالایی که حاوی اتیل استات بود به یک لوله ۵۰ ml انتقال یافت و سه مرحله قبل دوباره تکرار شد. بعد از این مرحله، ۵ gr سدیم سولفات اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس صورت گرفت؛ سپس در دور ۳۰۰۰ rpm نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و لایه حاوی اتیل استات به یک لوله ۱۰ میلی لیتری انتقال داده شد. نمونه‌ها تحت دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و گاز نیتروژن بخار شدند تا اینکه تقریباً حجم یک میلی لیتر از اتیل استات باقی ماند که این فرایند تقریباً در ۲۰ دقیقه انجام شد. نمونه باقی مانده به یک ویال ۱/۵ میلی لیتر انتقال داده شد و این بار در دمای ۶۰ درجه سانتی -

¹ N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1-10% Trimethylchlorosilane (TMCS)

بیشتری نمونه داشته باشد. نمودار تغییرهای این متابولیت‌ها در پیوست ۲ نیز ارائه شده است.

نقشه حرارتی ابزاری کارآمد برای شناسایی الگوها در داده‌های متابولیک است. این تحلیل می‌تواند به شناسایی تفاوت‌های مهم بین کلاس‌ها، روشن کردن نقش متابولیت‌ها و ارائه اطلاعات مهم برای پژوهش‌های آینده کمک نماید. نتیجه خوشه‌بندی به صورت نقشه حرارتی بین بیماران و آنالیت‌های اندازه‌گیری‌شده در شکل ۱ نشان داده شده است. اندازه‌گیری فاصله با استفاده از همبستگی و الگوریتم خوشه‌بندی بوده است و با توجه به داده‌های تکمیلی، می‌توان روابط جالبی بین متابولیت‌ها و کلاس‌ها یافت. این اطلاعات می‌تواند به شناسایی نشانگرهای بیولوژیکی یا متابولیکی برای هریک از کلاس‌ها کمک نماید و اطلاعات بینش‌دهنده‌ای برای پژوهش‌های بیشتر فراهم آورد.

تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA)^۴ در شکل ۲ بخش الف، نمودار امتیاز دوبعدی بین مؤلفه‌های اصلی (PC) را برای مقایسه دو گروه کنترل و اکتوپیک ارائه می‌دهد. این مؤلفه‌ها ابعاد جدیدی از داده‌ها هستند که با هدف بررسی واریانس و اطلاعات موجود استخراج شده‌اند. هر مؤلفه اصلی یک ترکیب خطی از متغیرهای اصلی محسوب می‌شود و ویژگی‌های مختلف و واریانس داده‌ها را در یک یا چند بُعد تعبیر می‌کند. ماتریس پراکندگی نشان‌دهنده ارتباط و توزیع داده‌ها در پنج مؤلفه اصلی (PC1 تا PC5) است. نتایج نشان می‌دهند که مؤلفه‌های اول و دوم قدرت تفکیک خوبی بین دو گروه دارند، درحالی‌که مؤلفه‌های پایین‌تر واریانس چندانی را توضیح نمی‌دهند. این تحلیل می‌تواند به طراحی روش‌های بهتر برای تجزیه و تحلیل داده‌ها کمک نماید.

در شکل ۲ بخش ب، نمودار Biplot تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) برای بررسی دو مؤلفه اصلی (PC1 و PC2) ارائه شده است. در این نمودار، توزیع نقاط مربوط به دو گروه (برچسب‌های صفر و ۱) به وضوح نمایش داده شده است. مؤلفه اول (PC1) حدود ۵۲/۵۳ درصد و مؤلفه دوم (PC2) حدود ۴۴/۹۳ درصد از واریانس کلی داده‌ها را توضیح می‌دهند که نشان‌دهنده تأثیر عمده این مؤلفه‌ها بر

نمونه‌ها در فرمت CSV، فایل موردنظر در سامانه آپلود شد. میزان سطح معنی‌داری، اختلاف بین دو گروه براساس آنالیز آزمون T (t-test) با انتخاب سطح معنی‌داری $p < 0.05$ موردبررسی قرار گرفت. میزان همبستگی بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز همبستگی پیرسون و میزان اعتبارسنجی بر اساس ضریب تعیین موردبررسی قرار گرفت. برای نمایش میزان ارتباط و همبستگی گروه‌ها نمودارهای PCA و OPLS-DA مورداریابی قرار گرفته و رسم شد. برای بررسی متابولیسم سلولی با استفاده از پایگاه‌های داده KEGG^۱ و HMDB^۲ برای تحلیل نقشه مسیر متابولیسم^۳ و آنالیز غنی‌سازی شده داده‌ها استفاده شد.

۳- نتایج

از مجموع ۱۱۶ متابولیت مورد مطالعه ۲۴ مورد در نمونه‌های موردبررسی مقادیر بالای صفر داشتند و مابقی مقادیر صفر بودند. متابولیت‌هایی که مقدار آستانه تغییر FC بیشتر از یک و $\log_2(FC)$ مثبت داشتند، مقدار میانگین متابولیت در گروه اکتوپیک کمتر از گروه کنترل بود و در آستانه تغییر پایین‌تر از یک با لگاریتم منفی، مقدار میانگین متابولیت در گروه اکتوپیک بیشتر بود. نتایج آنالیز t-test با سطح معنی‌داری $p < 0.05$ بین دو گروه موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز هم‌زمان FC و t-test به صورت هم‌زمان در جدول شماره یک به صورت آنالیز وولکانو نشان داده شده است. مقادیر متابولیت‌های فوماریک‌اسید و ۲-کتوگلوئاریک‌اسید به طور معنی‌داری در گروه اکتوپیک نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. مقادیر متابولیت‌های ۴-هیدروکسی فنیل‌لاکتیک‌اسید، پالمیتیک‌اسید و لاکتیک‌اسید به طور معنی‌داری در گروه اکتوپیک افزایش یافته بود. مقادیر متابولیت‌هایی مثل پیروویک‌اسید، سیتریک‌اسید و ۲-هیدروکسی‌ایزووالیریک‌اسید نیز به طور واضحی در گروه اکتوپیک نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود اما این افزایش معنی‌دار نبود و شاید نیاز به بررسی بیشتر در تعداد

¹ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

² Human Metabolome Database

³ Pathway Analysis

⁴ Principal Component Analysis

⁵ Principal Components

اسید لاکتیک به‌عنوان متغیرهایی که در جهت PC1 قرار دارند، تغییرهای قابل‌توجهی را در ساختار داده‌ها نشان می‌دهند. این نمودار به‌خوبی تفکیک بین دو گروه را نشان می‌دهند اما نمی‌تواند روابط دقیق بین متغیرهای وابسته و مستقل را تحلیل نماید.

ساختار داده‌هاست. فلش‌های سیاه در نمودار، متغیرهای مؤثر (مانند اسیدهای مختلف) را که بر روی دو مؤلفه تأثیر دارند نمایش می‌دهند. طول و جهت این فلش‌ها کمک می‌کند تا متغیرهایی که در تفکیک گروه‌ها نقش بیشتری دارند تشخیص داده شوند. به‌عنوان مثال، اسید پیروویک و

جدول ۱- آنالیز وولکانو، میزان تغییرهای آستانه تغییر به‌همراه میزان سطح معنی‌داری بین دو گروه بافت اکتوپیک اندومتريوز و بافت اندومتر نرمال

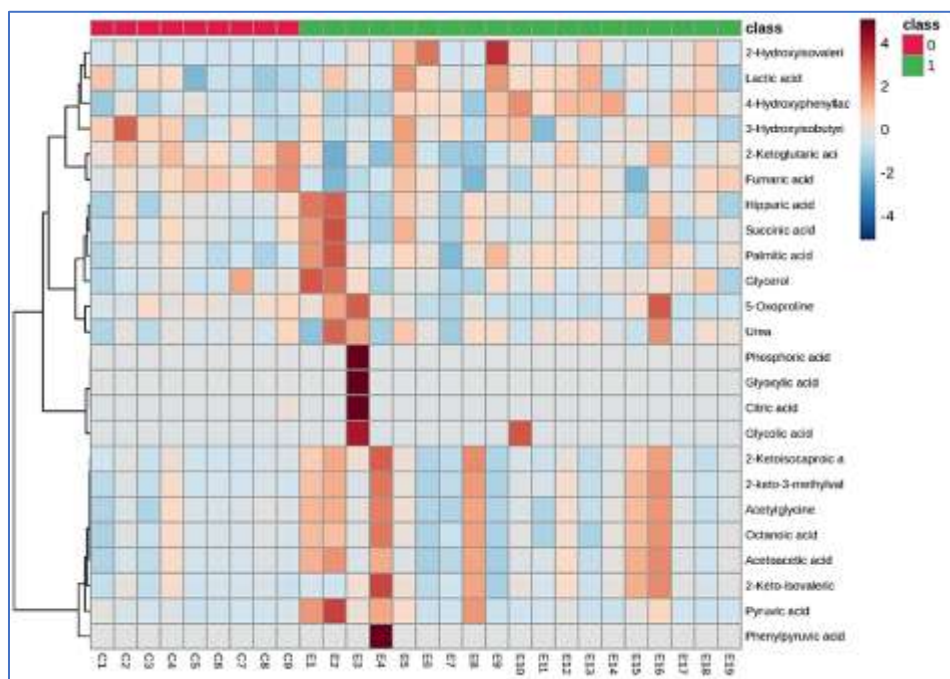
No	Metabolit Name	FC	log2(FC)	raw.pval	-log10
1	Fumaric acid	1.557	0.639	0.007	2.142
2	2-Ketoglutaric acid	1.465	0.551	0.019	1.716
3	3-Hydroxyisobutyric acid	1.179	0.237	0.407	0.391
4	5-Oxoproline	1.040	0.057	0.829	0.081
5	Succinic acid	0.918	-0.124	0.576	0.240
6	Glycerol	0.901	-0.151	0.476	0.322
7	Palmitic acid	0.840	-0.252	0.038	1.421
8	Urea	0.831	-0.268	0.250	0.602
9	Phosphoric acid	0.826	-0.276	0.502	0.300
10	Phenylpyruvic acid	0.826	-0.276	0.502	0.300
11	Glyoxylic acid	0.826	-0.276	0.502	0.300
12	Lactic acid	0.717	-0.480	0.043	1.370
13	Hippuric acid	0.704	-0.507	0.275	0.561
14	Acetoacetic acid	0.696	-0.522	0.105	0.977
15	2-Ketoisocaproic acid	0.689	-0.538	0.136	0.865
16	2-keto-3-methylvaleric	0.676	-0.565	0.107	0.969
17	Glycolic acid	0.671	-0.575	0.336	0.474
18	Octanoic acid	0.641	-0.642	0.176	0.753
19	4-Hydroxyphenyllactic acid	0.625	-0.678	0.016	1.786
20	2-Keto-isovaleric acid	0.613	-0.705	0.135	0.870
21	Acetylglycine	0.603	-0.730	0.168	0.774
22	Pyruvic acid	0.394	-1.344	0.123	0.912
23	Citric acid	0.328	-1.607	0.559	0.252
24	2-Hydroxyisovaleric acid	0.175	-2.512	0.080	1.098

T-score به تفکیک واضح‌تر بین گروه‌ها اشاره دارند. توضیح واریانس در OPLS-DA نسبت به PCA کمتر است (۱۰/۵ درصد و ۳۱/۴ درصد) که نشان‌دهنده تمرکز بالای OPLS-DA بر تفاوت‌های گروه‌ها و توانایی بهتر آن در شناسایی و تفکیک داده‌ها می‌باشد. این روش قادر است اثرهای ناهنجاری‌ها و متغیرهای زائده را جدا کرده و بر متغیرهای کلیدی تأکید کند. در شکل ۳ بخش ب، نمودار اعتبار مدل OPLS-DA و

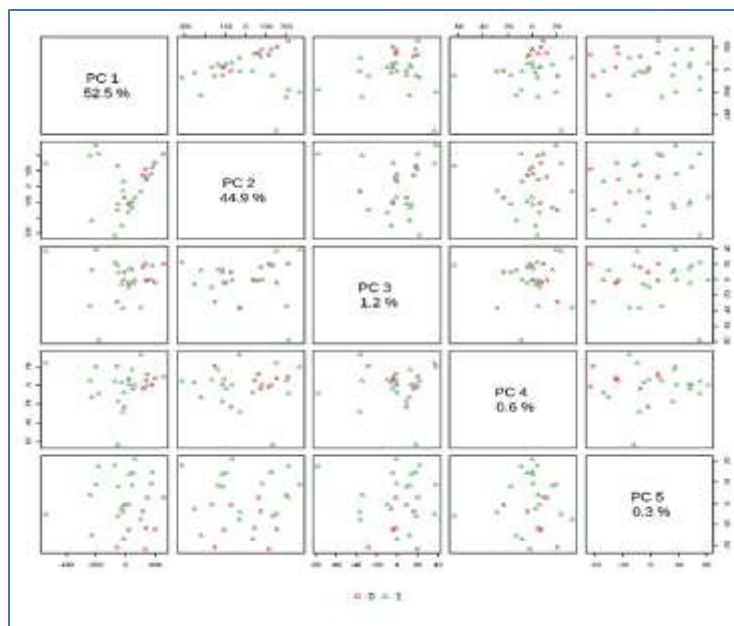
نمودار OPLS-DA (Scores Plot) در شکل ۳ بخش الف، نمودار OPLS-DA برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و نمایش اطلاعات گروه‌ها به‌کار رفته است. محورهای X و Y نمایانگر مؤلفه‌های جدید طراحی‌شده برای تفکیک و پیش‌بینی هستند. این روش به بررسی روابط خطی بین متغیرها می‌پردازد و نقاط قوت و ضعف آن‌ها را در پیش‌بینی و دسته‌بندی مشخص می‌نماید. نمرات Orthogonal T-score و

را نشان می‌دهد که به دقت پیش‌بینی مقادیر جدید اشاره دارد و با $p\text{-value} < 0.001$ معنادار است. نوارهای رنگی (آبی برای R^2Y Perm و صورتی برای Q^2 Perm) توزیع مقادیر به‌دست‌آمده از آزمون‌های مجازی‌سازی را نشان می‌دهند. قرارگیری مقادیر R^2Y و Q^2 در خارج از نوار توزیع مجازی به اعتبار و پیش‌بینی بهتر مدل OPLS-DA نسبت به موارد تصادفی دلالت دارد. این نمودار به‌طور مشخص اعتبار و پایداری مدل OPLS-DA را نشان می‌دهد. با توجه به مقادیر بالا برای R^2Y ، Q^2 و $p\text{-value}$ های معنادار، مدل به‌صورت مستقل و کارآمد عمل می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده از این مدل، شواهد قابل‌اعتنایی برای تأیید نتایج و یافته‌های پژوهش در مقاله را فراهم می‌آورد.

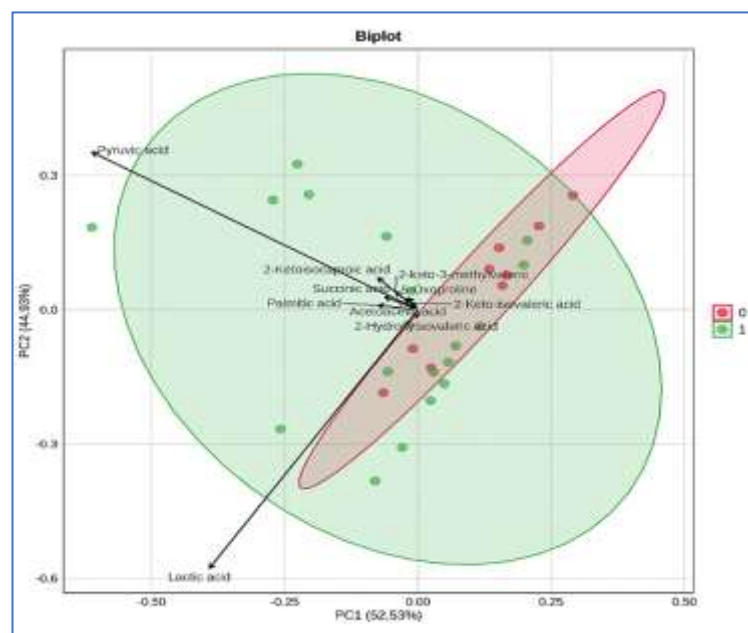
نتایج آزمون‌های مجازی‌سازی (Permutation Tests) را نشان می‌دهد. محور افقی نتایج آزمون‌های مجازی‌سازی شامل مقادیر R^2 و Q^2 را نمایش می‌دهد که به ارزیابی دقت و قدرت توجیه مدل کمک می‌کنند. محور عمودی حاوی فرکانس نتایج حاصل از آزمون‌های مجازی‌سازی است، به‌طوری‌که هر نوار نمایانگر تعداد دفعه‌های به‌دست‌آمده از مقادیر R^2 یا Q^2 است. مقدار R^2Y برابر با ۰/۷۸۲ نشان‌دهنده درصد واریانس توضیح داده‌شده از متغیر وابسته (Y) توسط متغیرهای مستقل (X) در مدل OPLS-DA است. این مقدار به‌خوبی نشان می‌دهد که مدل توانسته واریانس را تبیین کند. آزمون $p\text{-value} < 0.001$ معناداری آماری و غیرتصادفی بودن مدل را تأیید می‌کند. مقدار Q^2 برابر با ۰/۵۲۴، قدرت پیش‌بینی مدل



شکل ۱- این تصویر یک نقشه حرارتی از غلظت متابولیت‌ها در نمونه‌های مختلف را نمایش می‌دهد (۲۴ متابولیت). هر سطر نمایانگر یک متابولیت خاص است و هر ستون نشان‌دهنده یک نمونه (C1-9 نمایانگر گروه کنترل و E1-19 نمایانگر گروه اندومتروز) است. مقادیر غلظت متابولیت‌ها با استفاده از رنگ‌ها مشخص می‌شوند. رنگ آبی: نشان‌دهنده مقادیر پایین غلظت یا منفی است. رنگ قرمز: نمایانگر مقادیر بالا یا مثبت است. رنگ خاکستری: نشان‌دهنده عدم وجود یا سطح متوسطی از متابولیت‌ها است. مقیاس رنگی: در سمت راست شکل، مقیاس رنگی نشان می‌دهد که مقادیر متابولیت‌ها به چه صورت تفکیک شده است. مقادیر مثبت (قرمز) و منفی (آبی) از ۲- تا ۲+ متغیر هستند. بالای نقشه حرارتی: رنگ نوار بالایی، نمایانگر کلاس‌های مختلف نمونه‌ها است. قرمز: کلاس صفر یا گروه کنترل و سبز: کلاس ۱ نمایانگر گروه اندومتروز است.



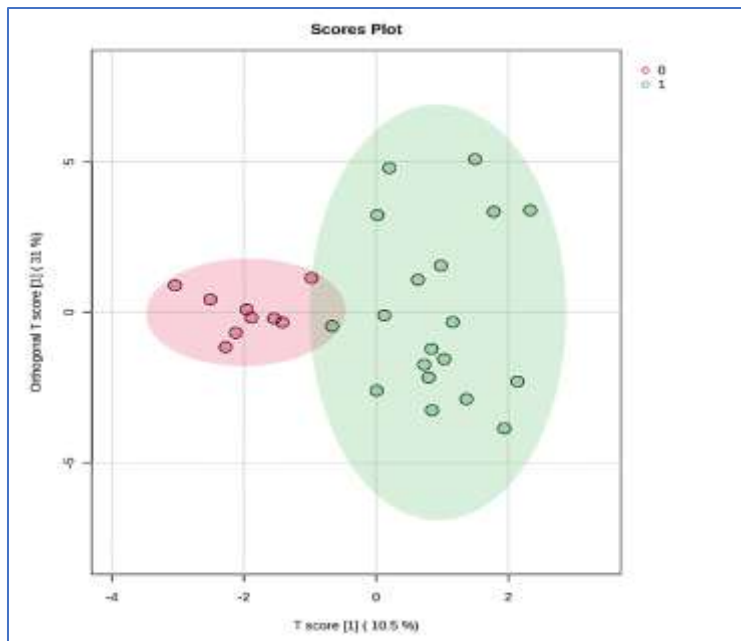
الف



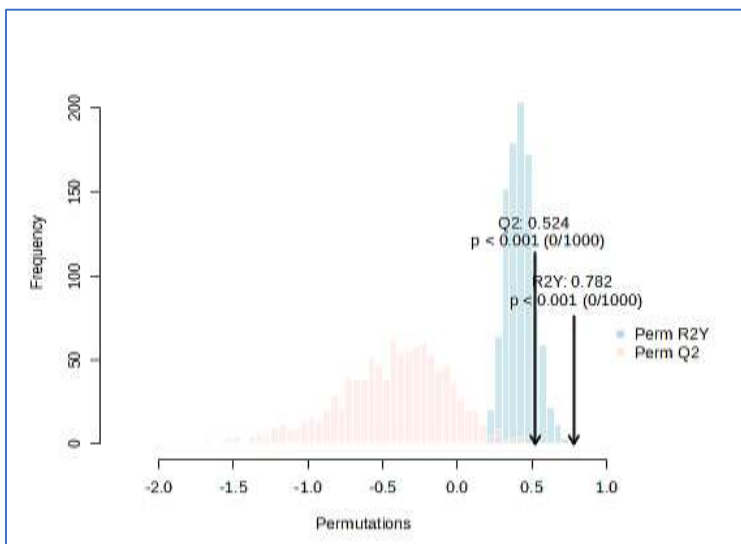
ب

شکل ۲- نمودار الف: ماتریس پراکندگی (Pairwise Plot) که تجزیه و تحلیل همبستگی میان مؤلفه‌های اصلی PCA را نمایش می‌دهد. هر مربع نمایانگر نسبت بین دو مؤلفه است و درصد واریانس توضیح‌شده در وسط آن درج شده است. نقاط قرمز (برچسب ۰) و سبز (برچسب ۱) نمایانگر دو گروه مختلف هستند. مؤلفه‌های اول و دوم (PC1 و PC2) بیشترین واریانس را دارند و بهترین قابلیت تفکیک را بین داده‌ها فراهم می‌کنند. سایر مؤلفه‌ها (PC3 تا PC5) واریانس کمتری دارند و نقش مشهودی در تفکیک گروه‌ها ندارند.

نمودار ب: Biplot تحلیل PCA که توزیع نقاط مربوط به دو گروه (بیماران اندومتریوز و گروه کنترل) را در فضای دوبعدی نمایش می‌دهد. درصد واریانس تبیین‌شده برای هر مؤلفه در کنار محورهای مربوطه قرار دارد. نقاط سبز و قرمز به ترتیب نشان‌دهنده گروه ۱ و صفر هستند. نواحی اطمینان (confidence ellipses) با رنگ‌های مربوط به هر گروه نشان داده شده و تداخل آن‌ها نشان‌دهنده هم‌پوشانی نمونه‌هاست. فلش‌های سیاه متغیرهای اصلی را که تأثیر قابل‌توجهی بر PC1 و PC2 دارند نشان می‌دهند و در تفسیر ساختار داده‌ها کمک می‌کنند.



الف

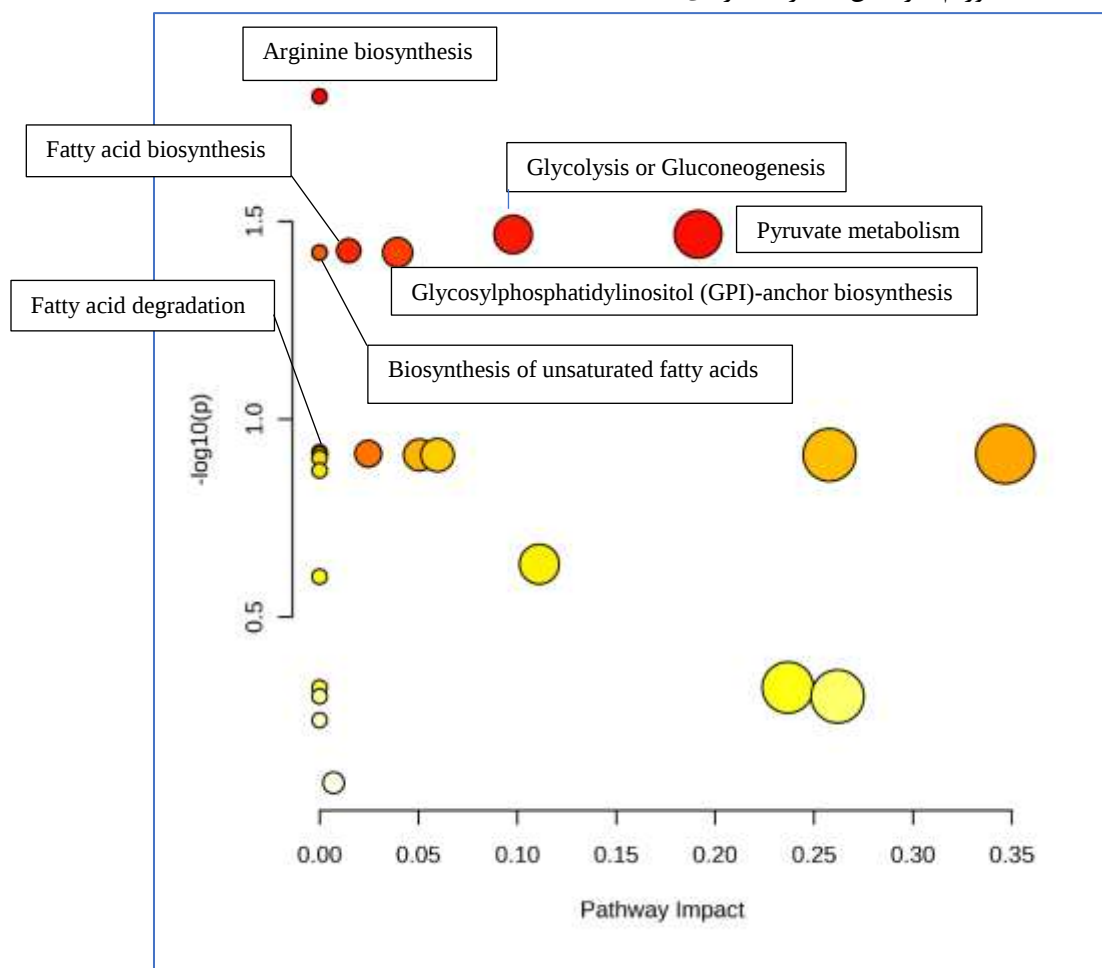


ب

شکل ۳- نمودار الف: نمودار نمرات (Scores Plot) تحلیل OPLS-DA. در این نمودار، نقاط مربوط به دو گروه مختلف (برچسب‌های صفر و ۱) به صورت دوتل نمایش داده شده‌اند. نوار سبز و قرمز اطراف هر گروه، نشان‌دهنده تفکیک واضح بین گروه‌ها براساس مقادیر T-score و Orthogonal T-score است. محور X نمایانگر نمره 1 [T-score] (۱۰/۵ درصد) و محور Y نمایانگر نمره 1 [Orthogonal T-score] (۳۱/۴ درصد) است. نمودار ب: نمودار آزمون مجازی‌سازی (Permutation Test) برای مدل OPLS-DA. در این نمودار، توزیع مقادیر Q^2 و R^2Y در آزمون‌های مجازی‌سازی نشان داده شده است. مقدار R^2Y (۰/۷۸۲) و Q^2 (۰/۵۲۴) نمایانگر قدرت توضیح و پیش‌بینی مدل هستند و نشان می‌دهند که مدل از نظر آماری معنادار است ($p < 0.001$). نوارهای رنگی نشان‌دهنده توزیع مقادیر مجازی‌سازی برای R^2Y (آبی) و Q^2 (صورتی) هستند.

متابولیسم سلولی با استفاده از کتابخانه KEGG pathway که در سال ۲۰۲۳ به روزرسانی شده، مسیرهای متابولیسم که تغییر معنی‌دار داشتند در شکل ۴ نشان داده شده است. جدول حاصل از آنالیز مسیر متابولیسمی در پیوست ۳ آمده است.

تحلیل مسیر با استفاده از پایگاه داده KEGG انجام شد تا نقش و ارتباط متابولیت‌ها و ژن‌ها را در فرایندهای بیولوژیکی شناسایی کنیم. این تحلیل به ما کمک می‌کند تا درک بهتری از شبکه‌های متابولیکی و بیوشیمیایی مرتبط با شرایط تجربی و بیماری‌های هدف به دست آوریم. براساس آنالیز مسیرهای



شکل ۴- تحلیل مسیر متابولیکی با توجه به اهمیت و تأثیر متابولیت‌ها براساس تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیسم سلولی با استفاده از پایگاه داده KEGG. تغییرهای مشاهده شده در تمامی مسیرهایی که نام آن‌ها ذکر شده است، از نظر آماری با سطح معنی‌داری $p < 0.05$ معنادار بوده‌اند. محور عمودی $(-\log_{10}(p))$: این محور نمایانگر سطح معناداری (p-value) هر مسیر است. مقادیر بالاتر نشان‌دهنده معناداری بیشتر است. محور افقی (Pathway Impact): این محور تأثیر هر مسیر متابولیکی را براساس نقش آن در فرایندهای بیوشیمیایی مختلف نشان می‌دهد. حجم دایره‌ها: نشان‌دهنده اهمیت یا تعداد شناسه‌های مرتبط با هر مسیر است. دایره‌های بزرگتر نشان‌دهنده مسیرهای متابولیک با تأثیر بیشتر هستند. مسیرهای با رنگ قرمز حاکی از تأثیر و اهمیت بالای بیوسنتز آرژنین و بیوسنتز اسیدهای چرب هستند. این نمودار به شناسایی مسیرهای متابولیکی کلیدی کمک می‌کند که ممکن است نقشی اساسی در پاتوفیزیولوژی بیماری داشته باشند.

۴- بحث

اندومتریوز با پاتوژن پیچیده‌ای مشخص می‌شود که هنوز به‌طور کامل روشن نشده است. مکانیسم‌های مختلفی، از جمله تغییرهای هورمونی، ایمنی، فعالیت سلول‌های بنیادی، تغییرهای ژنتیکی و اپیژنتیکی برای توضیح توسعه آن پیشنهاد شده است. علاوه بر این تأثیرهای محیطی و میکرومحیط متابولیک نیز ممکن است نقش‌های کمی در پاتوفیزیولوژی اندومتریوز ایفا کنند (۱۶، ۱۷). در این مطالعه، با توجه به اینکه آنالیز تغییرهای متابولیک در مطالعه *In-vitro* می‌تواند تغییرهای متابولیکی و فرایندهای متابولیسم سلولی را بدون دخالت سایر عوامل دخیل در فیزیولوژی طبیعی بدن نشان دهند، به بررسی تغییرهای متابولومیکس متابولیت‌ها و اسیدهای ارگانیک حاصل از متابولیسم سلولی در محیط کشت سلول‌های اکتوپیک بیماران مبتلا به اندومتریوز در مقایسه با گروه کنترل پرداخته شد. تحلیل متابولومیکس انجام‌شده در این مطالعه به نتایج قابل‌توجهی در تغییرهای متابولیکی اشاره دارد؛ به‌طوری‌که تغییرهای مشاهده‌شده در متابولیت‌ها می‌تواند بینش‌های جدیدی درباره نقش متابولیسم سلولی در پاتوفیزیولوژی اندومتریوز ارائه نیز دهند.

در نتایج حاصل از این مطالعه، همان‌طور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است متابولیت‌هایی مانند ۲-کتوگلوئوتاریک اسید با ($FC = 1/47$) و فوماریک اسید با ($FC = 1/56$)، در گروه اکتوپیک اندومتریوز، نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری (در هر دو با $p < 0.05$) مقدار کمتری دارند. اسید آلفا-کتوگلوئوتاریک (AKG) یک ترکیب شیمیایی است که در متابولیسم سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند. این اسید در فرایندهای متابولیک کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها دخالت دارد و به‌عنوان یک واسطه کلیدی در تبدیل آمینواسیدها عمل می‌کند. AKG از طریق آنزیم‌های ترانس‌آمیناز و د‌آمیناسیون به اسید گلوئامیک تبدیل می‌شود که برای سنتز پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی ضروری است. این ترکیب همچنین در چرخه اوره به دفع نیتروژن کمک کرده و در متابولیسم نوکلئوتیدهای پورین هم نقش دارد. افزون بر این، AKG ارتباط نزدیکی با فرایندهای رشد، بلوغ و پیری دارد. همچنین، گلوتامین و

آرژنین از طریق مسیرهای بیوشیمیایی مشخص به AKG تبدیل می‌شوند، که نشان‌دهنده اهمیت این اسید در متابولیسم نیتروژن است (۱۸-۲۲). طبق آنالیز مسیرهای متابولیسم سلولی در این مطالعه یکی از معنی‌دارترین تغییرها در متابولیسم آرژنین و گلوتامات رخ داده است. اسید فوماریک، یک اسید دیکربوکسیلیک است که به‌طور طبیعی در متابولیسم سلولی وجود دارد و نقش کلیدی در مسیرهای متابولیک، به‌ویژه در چرخه اسید سیتریک (مدار کربس) ایفا می‌کند. این چرخه در تولید انرژی (ATP) از مواد غذایی اهمیت دارد و به‌این‌ترتیب اسید فوماریک در تأمین انرژی سلول‌ها نقش مستقیم دارد (۲۳، ۲۴). علاوه بر نقش انرژی‌زایی، فوماریک اسید در واکنش‌های سیگنال‌دهی سلولی نیز دخالت می‌کند و می‌تواند به تنظیم پاسخ‌های التهابی و آنتی‌اکسیدانی کمک نماید (۲۵، ۲۶). متابولیت‌های چرخه تریکاربوکسیلیک (TCA) نیز در تنظیم سیگنالینگ سلول‌های ایمنی مؤثر هستند، به‌طوری‌که سوکسینات و ایتاکنات به‌ترتیب نقش‌های پیش و ضدالتهابی دارند. فوماریک اسید به‌ویژه در فعال‌سازی ماکروفاژها تأثیر دارد و تولید سایتوکین‌هایی مانند IL-10 و اینترفرون‌های نوع I را تنظیم می‌کند (۲۷). درک اهمیت این اسید می‌تواند به توسعه درمان‌های نوین در زمینه‌های مختلف پزشکی کمک نماید. سطوح غیرطبیعی آلفا-کتواسیدهای مانند آلفا-کتوگلوئوتاریک که به‌عنوان واسطه‌هایی در چرخه TCA عمل می‌کنند، با انواع اختلالات متابولیک مرتبط هستند. بنابراین، شناسایی و تعیین این ترکیب‌ها در مایعات بیولوژیکی می‌تواند در غربالگری، تشخیص و نظارت بر مجموعه‌ای از بیماری‌ها مفید باشد (۲۸).

از مهم‌ترین متابولیت‌های کاهش‌یافته در بافت اکتوپیک می‌توان به این موارد اشاره نمود که هرچند میزان تغییر در این متابولیت‌ها معنی‌دار نبود که شاید نیاز به مطالعه بر روی نمونه‌های بیشتر داشته باشند.

مقادیر متابولیت‌هایی مانند پیروویک اسید، سیتریک اسید و طبق نتایج گزارش‌شده در جدول شماره ۱، آن دسته از مقادیر متابولیت‌هایی که FC کمتر از یک و $\log_2(FC)$ منفی دارند، متابولیت‌های ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید (0.62)

افزایش هم‌زمان اسید سیتریک می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در چرخه کربس باشد. در صورتی که آنزیم‌های لازم در این چرخه به درستی عمل نکنند یا کمبود کوفاکتور وجود داشته باشد، سطح اسید سیتریک افزایش می‌یابد و این امر می‌تواند منجر به اثرهای متابولیکی نامطلوب شود. نتایج آنالیز مسیرهای متابولیسمی در این مطالعه، نشان‌دهنده اختلال معنی‌دار در متابولیسم چرخه سترات و TCA بودند. همچنین، شرایط استرس اکسیداتیو که در داده‌ها نشان داده شد، می‌تواند به تولید بیشتر اسید پیروویک و افزایش سطح اسید سیتریک منجر شود. در این وضعیت، سلول‌ها تلاش می‌کنند انرژی بیشتری تولید کنند تا با آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد مقابله نمایند.

علاوه بر مقادیر اسید پیروویک و اسید سیتریک، مقدار ۲-هیدروکسی‌ایزووالیریک اسید نیز به‌طور واضحی در گروه اکتوپیک ($FC = 0/17$) نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود اما این افزایش معنی‌دار نبود. افزایش مقدار ۲-هیدروکسی‌ایزووالیریک اسید که از متابولیت‌های والین، لوسین و ایزولوسین به‌عنوان آمینواسیدهای شاخه‌دار تعریف می‌شوند (۳۱) نیز نشان‌دهنده افزایش نرخ کاتابولیک در محیط کشت است.

نتایج آنالیز مسیرهای متابولیکی در این مطالعه نشان‌دهنده وجود تغییرهای معنی‌دار در چندین مسیر متابولیکی کلیدی بین دو گروه است که می‌تواند به درک بهتر پاتوژن اندومتروز کمک نماید. داده‌ها حاکی از اهمیت ویژه مسیرهایی نظیر سنتز آرژنین هستند. آرژنین در فرایندهای مربوط به تولید انرژی و تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی نیز نقش دارند. بنابراین اختلال در متابولیسم این اسیدهای آمینه با اختلال در فرایند تأمین انرژی به‌روش هوازی همراه خواهد بود. مسیر سنتز آرژنین به تولید نیتریک‌اکسید مرتبط است که نقش مهمی در التهاب دارد. تأثیر نیتریک‌اکسید و اختلال در متابولیسم آرژنین در فرایندهای پویا مانند پاسخ‌های التهابی و فیزیولوژیک ممکن است با علائم بالینی بیماران مبتلا به اندومتروز ارتباط مستقیمی داشته باشد (۳۲).

در این مطالعه، اختلالات معنی‌دار در متابولیسم پیرووات نیز مشاهده شده است. این یافته‌ها می‌توانند نشانه‌ای از اختلال

$FC = 0/84$) و پالمیتیک‌اسید ($FC = 0/71$) همگی با $p < 0/05$ به‌طور معنی‌داری در گروه اکتوپیک افزایش یافته بود. ۴-هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک‌اسید به‌عنوان یک متابولیت ناشی از تیروزین شناخته می‌شود (۲۹) و افزایش آن در بافت‌های اکتوپیک می‌تواند به‌معنای افزایش تجزیه پروتئین‌ها یا اختلال در متابولیسم تیروزین باشد. براساس نتایج این مطالعه، تغییرهای معنی‌داری در متابولیسم تیروزین مشاهده شده است. این متابولیت خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و می‌تواند تولید گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش دهد (۳۰). با توجه به التهاب مزمن مرتبط با اندومتروز، افزایش ۴-هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک اسید ممکن است به‌عنوان واکنش سلول‌ها به استرس اکسیداتیو و التهاب تعبیر شود. این افزایش می‌تواند به‌عنوان نشان‌دهنده وضعیت متابولیکی مهم و التهاب مزمن در نظر گرفته شود و به‌عنوان بیومارکری در تشخیص و مدیریت اندومتروز و ارزیابی شدت التهاب و وضعیت متابولیک بافت‌های اکتوپیک مفید باشد. بنابراین، درک بهتر از ۴-هیدروکسی‌فنیل‌لاکتیک‌اسید می‌تواند به توسعه روش‌های درمانی جدید و شناخت بیشتر از پاتوفیزیولوژی اندومتروز کمک کند.

اسید پیروویک ($FC = 0/39$) و اسید سیتریک ($FC = 0/33$) در گروه کنترل با کاهش زیاد ولی غیرمعنی‌داری همراه بودند که ممکن است به ناتوانی سلول‌های اکتوپیک در متابولیزه کردن این ترکیب‌ها برای تولید انرژی اشاره کند و نتیجه استرس متابولیکی یا آسیب‌های مرتبط با اندومتروز باشد. افزایش این متابولیت‌ها می‌تواند نشانه‌ای از تخریب نسوج یا استرس متابولیکی در بافت‌های اکتوپیک باشد. به‌ویژه، افزایش اسید پیروویک ممکن است به فعالیت بالای گلیکولیز مرتبط باشد زیرا سلول‌ها در تلاش‌اند تا انرژی را بدون اکسیژن تولید کنند. در این شرایط، پیرووات بیشتر تولید شده و ممکن است به اسید لاکتیک یا ترکیب‌های دیگر تبدیل شود. همچنین، با توجه به افزایش معنی‌دار سطح اسید لاکتیک ($FC = 0/71$)، در این مطالعه در پی افزایش اسید پیروویک، میزان لاکتیک نیز در بافت اکتوپیک افزایش یافته است.

که بافت‌های اکتوپیک در شرایط اندومتريوز دچار تغییرهای معناداری در متابولیت‌ها می‌شوند که می‌توانند منجر به مشکلات متابولیکی و اختلال در عملکرد طبیعی بافت‌ها گردند. بنابراین، توجه به این تغییرها می‌تواند راهنمایی برای شناسایی اهداف متابولیک مناسب در مدیریت اندومتريوز باشد و نیاز به تحلیل‌های عمیق‌تر برای آشکار ساختن مکانیسم دقیق این تغییرها و تأثیر آن‌ها بر پاتوفیزیولوژی اندومتريوز را مورد تأکید قرار می‌دهد. از نقاط قوت این مطالعه بررسی متابولیسم مستقیم سلول‌های اکتوپیک اندومتريوز بدون دخالت عوامل مداخله‌گر بود.

۶- ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه مطابق با اعلامیه هلسینکی و استانداردهای اخلاقی بین‌المللی اجرا شد. رضایت‌نامه آگاهانه کتبی از تمامی شرکت‌کنندگان اخذ گردید و اطلاعات شخصی آن‌ها به صورت محرمانه حفظ شد.

۷- قدردانی

از مراکز تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه قدردانی می‌شود که با همکاری کامل در اجرای مراحل عملی و آزمایشگاهی پروژه یاری رساندند. همچنین از خانم دکتر آمنه حق‌گو به دلیل نقش کلیدی در انتخاب و جمع‌آوری نمونه‌های بیماران سپاسگزاریم.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافع مالی یا غیرمالی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

۹- سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی مطالعه، جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها، نگارش اولیه و بازبینی مقاله مشارکت فعال داشته و نسخه نهایی را تأیید نموده‌اند.

۱۰- کد اخلاق:

این مطالعه پس از تأیید در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1398.406 آغاز شد.

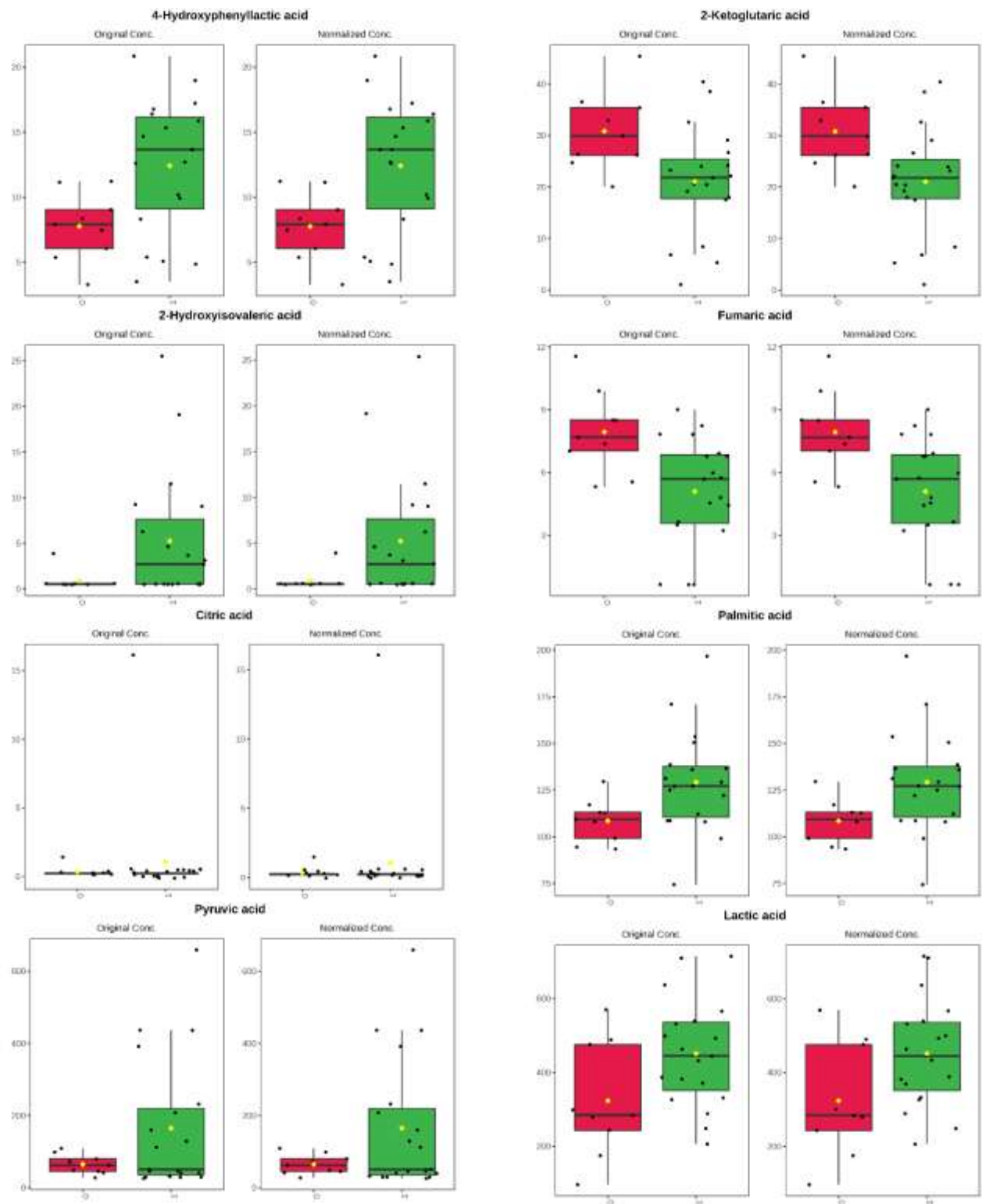
در تعادل متابولیکی در سلول‌های اکتوپیک بافت اندومتريوز باشند. این درحالی است که مطالعه‌های زیادی اختلال در سطح پیرووات و متابولیسم پیرووات را در بیماران اندومتريوز گزارش کرده‌اند (۳۳، ۳۴). طبق آنالیز داده‌ها، اختلال در متابولیسم گلیکولیز و گلوکونئوز نیز به‌طور معنی‌داری دیده شد. این اختلال در مطالعه‌های دیگر متعددی نیز گزارش شده بود (۳۳-۳۵). در این مطالعه، اختلال معنی‌داری در متابولیسم اسیدهای چرب در بسیاری از سطوح از جمله بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع، بیوسنتز اسیدهای چرب، تخریب اسیدهای چرب، افزایش طول اسیدهای چرب و حتی اختلال در بیوسنتز لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل‌اینوزیتول (GPI) دیده شد. این تغییرها با مطالعه‌های متعددی که در سطح بررسی متابولومیکس اندومتريوز، سلول‌های آسترومال اندومتريال و سرطان‌های اندومتر انجام شده مطابقت داشت (۳۶-۴۱). متابولیت‌هایی که در این پژوهش شناسایی شدند می‌توانند نشان‌دهنده تغییرهای قابل‌توجهی در مسیرهای متابولیک کلیدی، از جمله مسیرهای تولید انرژی، سنتز اسیدهای چرب، و تنظیم اکسیداسیون باشند. در کل، اختلال در این مسیرها می‌تواند به چالش‌های بالینی در مدیریت اندومتريوز دامن بزند و بر شناخت بیشتر از پاتوفیزیولوژی آن کمک نماید.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تغییرهای معناداری در مسیرهای متابولیکی بیماران مبتلا به اندومتريوز وجود دارد که می‌تواند به‌عنوان نشانه‌های بیولوژیکی جدید برای تشخیص و درمان هدفمند کاربرد داشته باشد. استفاده از رویکردهای متابولیک در درمان اندومتريوز و مداخلات غذایی یا دارویی بر روی این مسیرها می‌تواند علائم و کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشد. این تحقیق بر نقش تحلیل متابولومیکس در درک تغییرهای متابولیکی بافت اندومتريوز تأکید می‌کند و ممکن است مسیرهای بالقوه‌ای برای درمان‌های هدفمند در آینده ارائه دهد. بااین‌حال، پژوهش‌های آینده باید بر درک عمیق‌تر این مسیرها و تأثیرهای آن‌ها بر علائم بالینی تمرکز کند. بررسی‌های بیشتر با تعداد نمونه‌های وسیع‌تر برای تأیید نتایج و شناخت بهتر این تغییرها ضروری است. این داده‌ها نشان می‌دهند

جدول پیوست ۱: تعداد ۱۱۶ متابولیت که توسط کمپانی سازنده دستگاه به عنوان پنل تشخیصی برای بررسی اختلالات متابولیک و اختلالات ارگانیک اسید ستاپ شده به روش SIM مورد ارزیابی قرار گرفت.

NO	Metabolit Name	NO	Metabolit Name	NO	Metabolit Name
1	Lactic acid	41	Mevalonolactone	81	N-Acetylaspartic acid
2	2-Hydroxyisobutyric acid	42	mevalonolactone	82	2-Hydroxyadipic acid
3	Caproic acid	43	Isobutyrylglycine	83	Octenedioic acid
4	Glycolic acid	44	2-propyl-3-hydroxy-pentanoic acid	84	3-Hydroxyadipic acid
5	Glyoxylic acid	45	Mesaconic acid	85	Suberic acid
6	Oxalic acid	46	Glutaric acid	86	2-Keto-adipic
7	2-Hydroxybutyric acid	47	3-Methylglutaric acid	87	Aconitic acid
8	3-Hydroxypropionic acid	48	2-Propyl-3-ketopentanoic acid	88	Orotic acid
9	Pyruvic acid	49	Propionylglycine	89	Vanillic-2
10	Valproic acid	50	2-Deoxytetroneic acid	90	Homovanillic acid
11	3-Hydroxybutyric acid	51	Butyrylglycine	91	Azelaic acid
12	3-Hydroxyisobutyric acid	52	3-Methylglutaconic acid	92	Isocitric acid
13	2-Hydroxyisovaleric acid	53	Glutaconic acid	93	Citric acid
14	2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	54	succinylacetone	94	Hippuric acid
15	Malonic acid	55	decanoic-1	95	Homogentisic acid
16	3-Hydroxyisovaleric acid	56	2-Propyl-5-OH-pentanoic	96	Methylcitric acid
17	2-Keto-isovaleric acid	57	isovaleryl-glycine-1	97	3-(3-Hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid
18	Methylmalonic acid	58	Malic acid	98	3-Hydroxyoctenedioic acid
19	2-ethyl-3-OH-propionic	59	Adipic acid	99	3-Hydroxysebacic acid
20	Urea	60	Phenyllactic acid	100	Vanilmandelic acid
21	4-Hydroxybutyric acid	61	Isovaleryl-glycine	101	Sebacic acid
22	2-Hydroxyisocaproic acid	62	2-Hexenedioic acid	102	Decadienedioic acid
23	3-Hydroxyvaleric acid	63	5-Oxoproline	103	4-Hydroxyphenyllactic acid
24	2-Hydroxy-3-Methylvaleric acid	64	Thiodiglycolic acid	104	4-Hydroxyphenylpyruvic acid
25	Benzoic acid	65	3-Methyladipic acid	105	2-Hydroxyhippuric acid
26	Acetoacetic acid	66	2-Propyl-glutaric acid	106	3-Indoleacetic acid
27	Octanoic acid	67	7-Hydroxooctanoic acid	107	Palmitic acid
28	2-keto-3-methylvaleric	68	5-Hydroxy-2-furoic acid	108	2-Hydroxysebacic acid
29	Glycerol	69	Tiglylglycine	109	3-Hydroxysebacic acid
30	Phosphoric acid	70	3-Methylcrotonoylglycine	110	Dodecanedioic acid
31	Acetylglycine	71	3-Hydroxyglutaric acid	111	N-Acetyltyrosine
32	Ethylmalonic acid	72	2-Hydroxyglutaric acid	112	Uric acid
33	2-Ketoisocaproic acid	73	Pimelic acid	113	3,6-Epoxydodecanedioic acid
34	Phenylacetic acid	74	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	114	Suberyl-glycine
35	Maleic acid	75	3-Hydroxyphenylacetic acid	115	3-hydroxydodecanedioic acid
36	Succinic acid	76	4-Hydroxybenzoic acid	116	3,6-Epoxytetradecanedioic acid
37	Methylsuccinic acid	77	2-Ketoglutaric acid		
38	Glyceric acid	78	4-Hydroxyphenylacetic acid		
39	Fumaric acid	79	Hexanoylglycine		
40	Uracil	80	Phenylpyruvic acid		



پیوست ۲: نمودار تغییر متابولیت های بررسی شده در مقاله

جدول پیوست ۳: جدول مسیرهای متابولیسمی حاصل از آنالیز داده ها

Pathway	Total Cmpd	Hits	Raw p	-log10	Holm adjust	FDR	Impact
Arginine biosynthesis	14	3	0.015287	1.8157	0.41276	0.12798	0
Pyruvate metabolism	23	3	0.034112	1.4671	0.8869	0.12798	0.19137
Glycolysis or Gluconeogenesis	26	2	0.034142	1.4667	0.8869	0.12798	0.09785
Fatty acid biosynthesis	47	2	0.037517	1.4258	0.90041	0.12798	0.01473
Fatty acid degradation	39	2	0.037919	1.4211	0.90041	0.12798	0
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	32	1	0.037921	1.4211	0.90041	0.12798	0.03947
Fatty acid elongation	39	1	0.037921	1.4211	0.90041	0.12798	0
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	1	0.037921	1.4211	0.90041	0.12798	0
Lipoic acid metabolism	28	2	0.12114	0.91671	1	0.18813	0
Tyrosine metabolism	42	3	0.12225	0.91274	1	0.18813	0.02463
Cysteine and methionine metabolism	33	1	0.12259	0.91155	1	0.18813	0
Glycine, serine and threonine metabolism	33	2	0.12259	0.91155	1	0.18813	0
Arginine and proline metabolism	36	2	0.12259	0.91155	1	0.18813	0
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	3	0.1226	0.9115	1	0.18813	0.34667
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	5	0.12309	0.90977	1	0.18813	0.05048
Citrate cycle (TCA cycle)	20	5	0.12309	0.90977	1	0.18813	0.25782
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	5	0.12321	0.90936	1	0.18813	0.05963
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	3	0.12542	0.90163	1	0.18813	0
Pantothenate and CoA biosynthesis	20	1	0.1348	0.8703	1	0.19156	0
Butanoate metabolism	15	3	0.23242	0.63373	1	0.31376	0.11111
Purine metabolism	70	1	0.2499	0.60224	1	0.3213	0
Glycerolipid metabolism	16	1	0.47629	0.32213	1	0.54178	0.23676
Galactose metabolism	27	1	0.47629	0.32213	1	0.54178	0
Phenylalanine metabolism	8	1	0.50165	0.2996	1	0.54178	0.2619
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	1	0.50165	0.2996	1	0.54178	0
Propanoate metabolism	22	1	0.57597	0.2396	1	0.59812	0
Glutathione metabolism	28	1	0.82894	0.081476	1	0.82894	0.00709

۱۱- منابع

- 1.Tomassetti C, Johnson NP, Petrozza J, Abrao MS, Einarsson JI, Horne AW, et al. An international terminology for endometriosis, 2021(). Hum Reprod Open. 2021;2021(4):hoab029.
- 2.Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. N Engl J Med. 2020;382.۵۶-۱۲۴۴:(۱۳)
- 3.Appleyard CB, Flores I, Torres-Reverón A. The link between stress and endometriosis: from animal models to the clinical scenario. Reproductive Sciences. 2020;27(9):1675-86.
- 4.Horne AW, Saunders PTK. SnapShot: Endometriosis. Cell. 2019;179.-۱۶۷۷:(۷)e1.
- 5.Armstrong GM, Maybin JA, Murray AA, Nicol M, Walker C, Saunders PT, et al. Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model. Scientific reports. 2017;7(1):1-14.
- 6.Ali Mohebbi Vh, Masoumeh majidi zolbin, Reza Aflatoonian. Histopathologic Evaluation of the Inflammatory Factors and Stromal Cells in the Endometriosis Lesions: A case-control study , inpress. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2022.
- 7.Coller HA. Is cancer a metabolic disease? The American journal of pathology. 2014;184(1):4-17.
- 8.Peng B, Li H, Peng X-X. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. Protein & Cell. 2015;6(9):628.۳۷-
- 9.Marciano DP, Snyder MP. Personalized metabolomics. High-Throughput Metabolomics: Methods and Protocols. 2019:447-56.
- 10.Goulielmos GN, Matalliotakis M, Matalliotaki C, Eliopoulos E, Matalliotakis I, Zervou MI. Endometriosis research in the-omics era. Gene. 2020;741:144545.
- 11.KLUPCZY—SKA A, DEREZI—SKI P, Kokot ZJ. Metabolomics in medical sciences n trends, challenges and perspectives. Acta poloniae pharmaceutica. 2015:629.
- 12.Yang H, Lau WB, Lau B, Xuan Y, Zhou S, Zhao L, et al. A mass spectrometric insight into the origins of benign gynecological disorders. Mass spectrometry reviews. 2017;36(3):450-70.
- 13.Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. Nature. 2008;455(7216):1054-6.
- 14.Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. The future of NMR-based metabolomics. Current opinion in biotechnology. 2017;43:34-40.
- 15.Nematian SE, Mamillapalli R, Kadakia TS, Majidi Zolbin M, Moustafa S, Taylor HS. Systemic inflammation induced by microRNAs: endometriosis-derived alterations in circulating microRNA 125b-5p and Let-7b-5p regulate macrophage cytokine production. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2018;103(1):64-74.
- 16.Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, Martin DC. The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights. International journal of molecular sciences. 2019;20(22):5615.
- 17.Monnin N, Fattet AJ, Koscinski I. Endometriosis: update of pathophysiology,(epi) genetic and environmental involvement. Biomedicines. 2023;11(3):978.
- 18.Gavran M, Gantner V. The metabolism of amino acids. 2023.
- 19.Legendre F, MacLean A, Appanna V, Appanna V. Biochemical pathways to α -ketoglutarate, a multi-faceted metabolite. World Journal of Microbiology and Biotechnology. ۱۲۳:(۸)۳۶;۲۰۲۰ .
- 20.Moedas MF, Simões RJ, Silva MF. Mitochondrial targets in hyperammonemia: Addressing urea cycle function to improve drug therapies. Biochemical Pharmacology. 2024:116034.
- 21.Liu S, Yang J, Wu Z. The regulatory role of α -ketoglutarate metabolism in macrophages. Mediators of inflammation. 2021;2021(1):5577577.
- 22.Yanamadala V. Amino Acid Metabolism. Essential Medical Biochemistry and Metabolic Disease: A Pocket Guide for Medical Students and Residents: Springer; 2024. p. 91-123.

- 23.Haddad A, Mohiuddin SS. Biochemistry, citric acid cycle. StatPearls [internet]: StatPearls Publishing; 2023.
- 24.Sebastian J, Hegde K, Kumar P, Rouissi T, Brar SK. Bioproduction of fumaric acid: An insight into microbial strain improvement strategies. *Critical reviews in biotechnology*. 2019;39(6):817-34.
- 25.He S, Yin Q, Xiong Y, Liu D, Hu H. Effects of dietary fumaric acid on the growth performance, immune response, relative weight and antioxidant status of immune organs in broilers exposed to chronic heat stress. *Czech Journal of Animal Science*. 2020;65.(۳)
- 26.Sánchez-García FJ, Pérez-Hernández CA, Rodríguez-Murillo M, Moreno-Altamirano MMB. The role of tricarboxylic acid cycle metabolites in viral infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11:725043.
- 27.Peace CG, O'Carroll SM, O'Neill LA. Fumarate hydratase as a metabolic regulator of immunity. *Trends in Cell Biology*. 2024;34(6):442-50.
- 28.Makahleh A, Ben-Hander GM, Saad B. Determination of α -ketoglutaric and pyruvic acids in urine as potential biomarkers for diabetic II and liver cancer. *Bioanalysis*. 2015;7(6):713-23.
- 29.Kasperek MC, Galeas AV, Caetano-Silva ME, Xie Z, Ulanov A, La Frano M, et al. Microbial aromatic amino acid metabolism is modifiable in fermented food matrices to promote bioactivity. *Food Chemistry*. 2024;454:139798.
- 30.Rosas HD, Doros G, Bhasin S, Thomas B, Gevorkian S, Malarick K, et al. A systems-level "misunderstanding": the plasma metabolome in Huntington's disease. *Annals of clinical and translational neurology*. 2015;2(7):756-68.
- 31.Inoue N, Nishida Y, Harada E, Sakai K, Narahara H. GC-MS/MS analysis of metabolites derived from a single human blastocyst. *Metabolomics*. 2021;17:1-7.
- 32.Oyovwi MO, Atere AD. Exploring the medicinal significance of l-Arginine mediated nitric oxide in preventing health disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2024;12:100175.
- 33.Lu J, Ling X, Liu L, Jiang A, Ren C, Lu C, Yu Z. Emerging hallmarks of endometriosis metabolism: a promising target for the treatment of endometriosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular Cell Research*. 2023;1870(1):119381.
- 34.Huang S, Huang X, Wen X, Liu X, Ma H, Xie L, et al. Enhanced glycolysis in the myometrium with ectopic endometrium of patients with adenomyosis: a preliminary study. *Gynecological Endocrinology*. 2024;40(1):2332411.
- 35.Collie B, Troisi J, Lombardi M, Symes S, Richards S. The Current Applications of Metabolomics in Understanding Endometriosis: A Systematic Review. *Metabolites*. 2025;15(1):50.
- 36.Turathum B, Gao E-M, Grataitong K, Liu Y-B, Wang L, Dai X, Chian R-C. Dysregulated sphingolipid metabolism and autophagy in granulosa cells of women with endometriosis. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:906570.
- 37.Liu M, Peng R, Tian C, Shi J, Ma J, Shi R, et al. Effects of the gut microbiota and its metabolite short-chain fatty acids on endometriosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2024;14:1373004.
- 38.Marcinkowska A, Górnicka M. The role of dietary fats in the development and treatment of endometriosis. *Life*. 2023;13(3):654.
- 39.Yamashita Y, Nishiumi S, Kono S, Takao S, Azuma T, Yoshida M. Differences in elongation of very long chain fatty acids and fatty acid metabolism between triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC cancer*. 2017;17:1-21.
- 40.Rashid N, Nigam A, Jain S, Naqvi SH, Wajid S. Proteomic sift through serum and endometrium profiles unraveled signature proteins associated with subdued fertility and dampened endometrial receptivity in women with polycystic ovary syndrome. *Cell and tissue research*. 2020;380(3):593-614.

41.Peng H-Y, Lei S-T, Hou S-H, Weng L-C, Yuan Q, Li M-Q, Zhao D. PrPC promotes endometriosis progression by reprogramming cholesterol metabolism and estrogen biosynthesis of endometrial stromal cells through PPAR α pathway. International Journal of Biological Sciences. 2022;18(4):1755.