

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

На правах рукописи

МЕЖЛУМОВА

Наталья Арсеновна

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ НАРУЖНОГО
ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

академик РАН, доктор медицинских наук,

профессор Л.В. Адамян,

кандидат химических наук М.Ю. Бобров

Москва – 2020

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Биомаркеры эндометриоза: возможности раннего выявления и диагностики рецидивов заболевания (обзор литературы).....	14
1.1. Современный взгляд на проблему эндометриоза.....	14
1.2. Классификация эндометриоза.....	19
1.3 Клиническая картина и современные методы диагностики наружного генитального эндометриоза.....	20
1.4. Факторы риска развития рецидива наружного генитального эндометриоз.....	23
1.5. Тактика ведения и лечения женщин репродуктивного возраста с наружным генитальным эндометриозом.....	25
1.6 Биомаркеры развития эндометриоза.....	27
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	34
2.1. Клинико-лабораторные методы исследования.....	34
2.2. Молекулярно-биологические методы исследования.....	40
Глава 3. Результаты собственных исследований.....	45
3.1. Клиническая характеристика больных наружным генитальным эндометриозом.....	45
3.2. Результаты молекулярных исследований у больных наружным генитальным эндометриозом.....	57
3.2.1. Анализ экспрессии микроРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия.....	57
3.2.2. Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии.....	62
3.2.3. Дифференциальная экспрессия микроРНК в стромальных клетках эндометрия.....	62
3.2.4. Функциональный анализ генов-мишеней малых РНК.....	66
3.2.5. Валидация данных секвенирования методом ПЦР.....	68

3.2.6. Протеомный анализ белков стромальных клеток эктопического и эутопического эндометрия.....	69
3.2.7. Дифференциальная экспрессия пивиРНК в тканях эндометрия.....	73
Глава 4. Обсуждение полученных результатов.....	76
Выводы.....	108
Практические рекомендации.....	110
Список сокращений.....	111
Список литературы.....	113
Приложения.....	142

Введение

Актуальность темы исследования

Эндометриоз – одно из наиболее распространенных гинекологических заболеваний, которое встречается у 10% женщин репродуктивного возраста, обнаруживается у 35-50% женщин с тазовой болью и бесплодием и занимает 3-е место после воспалительных заболеваний и миомы матки [1, 2, 3]. Эндометриозные гетеротопии часто формируются на париетальной и висцеральной брюшине малого таза и поражают Дугласово пространство, стенки прямой кишки, мочевого пузыря, влагалища и матки, крестцово-маточные связки, яичники [3, 4]. Прогрессирование эндометриоза может приводить к инфильтративному поражению перечисленных органов, а также формированию фиброзных спаек в малом тазу, которые приводят к функциональным нарушениям, бесплодию, тазовым болям и снижению качества жизни у пациенток, страдающих данным заболеванием [5].

В ходе работ, проведенных за последнее время, установлено, что в основе патогенеза заболевания может лежать дисрегуляция гормональных, пролиферативных и иммунных реакций в тканях эктопического эндометрия [6]. Важно подчеркнуть, что на сегодняшний день имеется мало данных, указывающих на присутствие специфических молекулярных сигнатур, характерных для эндометриозных гетеротопий различной локализации [7, 17]. Несмотря на высокую распространенность эндометриоза и длительную историю его изучения, проблема выявления точных этиопатогенетических механизмов развития данной патологии остается нерешенной [9, 17]. Одним из перспективных подходов в данном направлении является поиск характерных биомаркеров патологического процесса, что, по мнению исследователей, может способствовать выявлению специфических патогенетических путей развития заболевания, а также обозначить молекулярные мишени для возможного терапевтического воздействия [10, 11].

Современные методы лечения эндометриоза ограничиваются хирургическим вмешательством, назначением гормональной терапии, направленной на купирование

болевого синдрома и снижение вероятности рецидива заболевания, однако эти методы не всегда приводят к длительной ремиссии, устранению болевого синдрома и часто сопровождаются побочными эффектами и осложнениями [12]. При этом в значительной степени сохраняется вероятность возникновения рецидива данного заболевания [13]. Золотым стандартом диагностики наружного генитального эндометриоза является лапароскопия с прицельной биопсией подозрительных очагов и их последующим гистологическим исследованием [8, 14, 15, 16, 17]. Однако данный метод является инвазивным, дорогостоящим и требует высокой степени подготовки хирурга, а также время от появления первых симптомов до постановки диагноза может занимать много лет [18].

Проблемы в лечении и диагностике эндометриоза во многом связаны с недостаточностью представлений о патогенезе заболевания. В этой связи представляются актуальными исследования, направленные на детализацию патогенетических механизмов, лежащих в основе формирования и развития эндометриозных гетеротопий, выявление патогенетических маркеров для разработки неинвазивных методов диагностики и терапии, позволяющей сохранить репродуктивную функцию женщин, а также на прогнозирование возникновения рецидива заболевания.

Степень разработанности темы исследования

Патогенез наружного генитального эндометриоза остается не до конца известным. Распространение и развитие эктопического эндометрия вызвано комбинацией нескольких aberrantly протекающих биологических процессов: ретроградная менструация, изменения функций тканей-реципиентов и иммунокомпетентных клеток, в результате которых происходят нарушения регуляции пролиферации и апоптоза клеток эндометрия, которые расположены вне полости матки [11, 15]. Не исключается также генетическая предрасположенность и возможное влияние пока невыясненных экологических факторов [15]. Поэтому изучение молекулярных аспектов патогенеза эндометриоза является актуальным

направлением современных исследований. Понимание и уточнение механизмов патогенеза НГЭ может способствовать развитию новых неинвазивных и эффективных методов лечения данного заболевания.

В последнее время активно изучается роль малых некодирующих РНК, таких как микроРНК (microRNA) и пивиРНК (piwiRNA) в регуляции экспрессии генов как в норме, так и при патологии. Установлено, что данные РНК выполняют роль пост-транскрипционных репрессоров за счет взаимодействия с мРНК-мишенями, что приводит либо к деградации соответствующей мРНК, либо к остановке трансляции. Таким образом, дисбаланс регуляторных влияний малых РНК может приводить к изменению экспрессии генов-мишеней и вносить существенный вклад в развитие патологических процессов. В ряде работ были показаны отличия экспрессии микроРНК в эктопическом и эутопическом эндометрии, однако выяснение роли микроРНК их генов-мишеней в патогенезе эндометриоза требует дальнейших исследований. Остается открытым вопрос о специфичности экспрессии микроРНК в зависимости от локализации эндометриоидного очага и фазы менструального цикла. Важно отметить, что экспрессия пивиРНК (piwiRNA) и их роль в патогенезе эндометриоза остается практически не изученной.

Таким образом, идентификация малых РНК в патологически измененных тканях, эндометрии и определение роли регулируемых ими генов-мишеней в патогенезе различных форм эндометриоза представляется перспективным направлением исследований для разработки новых диагностических подходов и выявления фармакологических мишеней для терапии этого заболевания.

Цель исследования

Повышение эффективности методов диагностики и прогнозирования течения эндометриоза на основании определения значения микроРНК и их белков-мишеней в качестве патогенетических и диагностических маркеров различных форм наружного генитального эндометриоза у пациенток репродуктивного возраста.

Задачи исследования

1. Провести анализ клинико-анамнестических характеристик пациенток с различными формами наружного генитального эндометриоза, выделить особенности течения заболевания, хирургического лечения и частоты бесплодия у пациенток с эндометриоидными кистами яичников и ретроцервикальным эндометриозом.

2. Провести сравнительный анализ дифференциальной экспрессии малых РНК в тканях эутопического и эктопического эндометрия у больных с эндометриоидными кистами яичников и ретроцервикальным эндометриозом в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.

3. Определить дифференциальную экспрессию микроРНК и белков в стромальных клетках эктопического и эутопического эндометрия с использованием транскриптомного и протеомного анализа.

4. На основании биоинформационных баз данных и протеомного исследования определить потенциальные гены-мишени дифференциально экспрессированных микроРНК и регулируемые ими пути внутриклеточной сигнализации.

5. Изучить ближайшие и отдаленные результаты после лечения пациенток репродуктивного возраста с эндометриозом с целью оценки течения послеоперационного периода, восстановления репродуктивной функции и развития рецидивов заболевания.

6. Охарактеризовать совокупное значение всех изученных молекулярных маркеров в патогенезе эндометриоза и дать оценку их возможной роли в диагностике заболевания и прогнозировании его рецидивов.

Научная новизна исследования

На основании проведенного исследования были выявлены клинико-анамнестические показатели, отражающие высокий риск развития эндометриоза, среди которых наиболее значимыми являются наследственная

предрасположенность и наличие отягощенного преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе.

После оперативного лечения по поводу эндометриоза частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, выше у женщин, которым выполняли иссечение очагов ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31. Беременность наступила у 52% женщин с бесплодием, обратившихся за оперативным лечением по поводу эндометриоза.

В результате анализа экспрессии микроРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия представлены и научно обоснованы новые данные о патогенезе наружного генитального эндометриоза. Впервые была проведена сравнительная оценка экспрессии микроРНК в тканях эндометриоидных кист яичников и ретроцервикальных гетеротопиях относительно тканей эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и у пациенток без данной патологии. Представлена оценка влияния фазы менструального цикла на экспрессию микроРНК в исследуемых тканях эндометрия. Выявлены характерные различия в экспрессии микроРНК в зависимости от локализации очага и фазы менструального цикла.

Проведен одновременный транскриптомный и протеомный анализ, который позволил выявить молекулярные маркеры (микроРНК и регулируемые ими белковые мишени) в стромальных клетках эктопического эндометрия. Сравнительный анализ образцов стромальных клеток эктопического эндометрия пациенток с рецидивом и без него определил потенциальные маркеры для прогнозирования рисков рецидивирования эндометриоза.

Впервые выявлено присутствие представителей класса пивиРНК (piwiRNA) в тканях эктопического эндометрия при эндометриозе, а также показана их дифференциальная экспрессия.

Практическая значимость исследования

Подтвержден высокий риск развития эндометриоза у женщин с наследственной предрасположенностью к развитию заболевания и наличие отягощенного преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе.

Изучение ближайших и отдаленных результатов лечения показало высокую эффективность оперативного лечения, что подтверждается большой частотой наступления беременности, в том числе самопроизвольной и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, а также низкой частотой развития рецидивов.

На основании проведенного анализа обоснована целесообразность и актуальность исследований молекулярных маркеров в тканях эктопического и эутопического эндометрия, позволяющих расширить представления о патогенезе эндометриоза и определить возможные молекулярные мишени для терапевтического воздействия.

Установленные отличия в экспрессии ряда микроРНК в эутопическом эндометрии у женщин, страдающих эндометриозом и без данной патологии, в перспективе могут иметь практическое применение, поскольку биопсия слизистой матки является малоинвазивной процедурой, а анализ маркерных РНК может служить дополнительным методом диагностики эндометриоза.

Проведение комплексного исследования молекулярных характеристик в тканях эндометрия позволит осуществить более тщательный клиничко–лабораторный контроль за течением заболевания. Мониторинг предложенных параметров позволит своевременно направлять пациенток для оперативного вмешательства и оценивать эффективность проводимого лечения.

Внедрение нового алгоритма диагностики эндометриоза позволит выявить заболевание на ранней стадии, своевременно назначить лечение и предотвратить возникновение рецидивов.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала анализ течения, прогнозирование развития наружного генитального эндометриоза и возникновения его рецидивов. Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины (отбор больных и статистическая обработка результатов). Работа выполнена с использованием клинических, инструментальных, лабораторных, молекулярно-биологических и статистических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. К клиничко-анамнестическим факторам риска развития наружного генитального эндометриоза относятся наличие преморбидного фона в виде перенесенных воспалительных заболеваний, а также отягощенный семейный анамнез у 25% пациенток с эндометриоидными кистами яичников и 44% с ретроцервикальным эндометриозом. Основные клинические проявления различных форм наружного генитального эндометриоза – боли внизу живота, болезненные менструации, диспареуния, наиболее выраженные при ретроцервикальном эндометриозе.

2. Вероятность наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, после оперативного вмешательства по поводу эндометриоза выше у женщин, которым было выполнено иссечение ретроцервикального эндометриоза.

3. Уровень экспрессии микроРНК зависит от локализации очага и фазы менструального цикла. В эутопической эндометрии больных эндометриозом имеет место повышение экспрессии miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных диагностических маркеров эндометриоза. Выявленная дифференциальная экспрессия пивиРНК (piwiRNA) в тканях эндометрия, а также участие генов-мишеней пивиРНК в сигнальных каскадах, регулирующих процессы клеточного деления, могут свидетельствовать о

возможном вкладе пивиРНК в патогенетические механизмы развития эндометриоза.

4. Стромальный компонент играет важную роль в тканевой экспрессии микроРНК в эндометриоидных кистах яичника. По данным протеомного анализа в стромальных клетках выявлено 18 белков, являющихся потенциальными мишенями дифференциально экспрессированных микроРНК. У больных с последующим рецидивом заболевания происходит изменение экспрессии белков статмин-1, кальпонин-1, аннексин-А4 и белка теплового шока А2 в стромальных клетках эндометриоидных кист яичника, что позволяет рассматривать данные белки в качестве потенциальных прогностических маркеров рецидива.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении и постановке цели и задач работы, разработке дизайна исследования, систематизации данных литературы по теме диссертации и анализе клинико-анамнестических данных. Автор лично участвовал в обследовании, оперативном лечении больных, их послеоперационном ведении и реабилитации. Автором проведен анализ медицинской документации, статистическая обработка данных и научное обобщение полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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 «акушерства и гинекология».

Степень достоверности полученных результатов

Степень достоверности полученных результатов достигнута за счет математической обработки материала параметрическими и непараметрическими методами. Для оценки межгрупповых различий применяли критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов с доверительным интервалом 95%. Различия между статистическими величинами считались достоверными при $p < 0,05$.

Апробация работы

Основные результаты исследования представлены на II Национальном Конгрессе «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020), XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2020), XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 2020).

Апробация диссертации проведена на межклинической конференции (03.07.2020) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (03.08.2020, протокол № 25).

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные научные и практические данные внедрены в работу гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы, из них 3 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах печатного текста и состоит из введения, 4 глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, результатам собственных наблюдений, обсуждению полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 9 рисунками. Библиографический указатель содержит 299 источников, из них 55 отечественных и 244 зарубежных.

Глава 1. Биомаркеры эндометриоза: возможности раннего выявления и диагностики рецидивов заболевания (обзор литературы)

1.1 Современный взгляд на проблему эндометриоза

Проблема эндометриоза изучается более 150 лет, однако до сих пор точно не установлены причины возникновения и патогенез этого заболевания [5, 19, 20].

Эндометриоз является одним из наиболее распространенных гинекологических заболеваний, которое возникает у 10% женщин репродуктивного возраста. В связи с тем, что эндометриоз может протекать бессимптомно, его истинную распространенность оценить затруднительно [21, 22]. В структуре гинекологической патологии эндометриоз занимает 3-е место после воспалительных заболеваний и миомы матки [19, 23].

Эндометриоз – патологический процесс, при котором вне полости матки определяется наличие ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию [19, 24]. В соответствии с утверждением J.S. Sanfilippo [25], патологические изменения, похожие на эндометриоз, были описаны в одном из найденных египетских папирусов уже за 1600 лет до н.э. Термин «эндометриоз» был предложен в 1892 г. Blair Bell [3].

Учитывая многообразие клинических симптомов: циклические и хронические боли, дисменорею, бесплодие, аномальные маточные кровотечения, нарушение функции соседних органов и другие жалобы, снижающие качество жизни, в том числе психоэмоциональный статус у женщин преимущественно репродуктивного возраста, эндометриоз остается одним из социально и демографически значимых заболеваний, требующих мультидисциплинарного подхода [8].

В настоящее время существуют многочисленные теории возникновения эндометриоза. Наиболее актуальными являются: имплантационная теория [9, 10]; метапластическая теория – трансформация мезотелия брюшины и других тканей в «эндометриоподобную ткань» под воздействием гормонов, воспаления и

механических повреждений [11]; дизонтогенетическая теория, открытая в конце XIX века [12] и основанная на нарушении эмбриогенеза и образовании эндометриоидной ткани из аномально расположенных зачатков Мюллерова канала [13, 14]; иммунологическая теория, подтверждаемая значительными изменениями местных и системных факторов [15, 16, 17]. Также можно выделить теории патогенеза данного заболевания, связанные с нарушением гормональной регуляции на уровне гипоталамус-гипофиз-яичники-органы мишени [18, 19], генетической патологией [20], «метастазированием» лимфогенным и/или гематогенным путями [21], хирургическими вмешательствами [22, 23], влиянием экологических факторов [24].

Несмотря на многочисленные исследования факторов, участвующих в генезе и прогрессировании эндометриоза, патогенез этого заболевания остается неизвестным, а причины возникновения эндометриоза до сих пор являются предметом дискуссии.

В развитии заболевания участвуют множество различных факторов: повышение концентрации стероидных гормонов (эстроген и прогестерон), семейная предрасположенность (например, гены *NOXA10* и *NOXA11*), факторы роста (например, сосудистый эндотелиальный фактор роста-VEGF и трансформирующий фактор роста), интерлейкин-1 β , 6, 8, раннее наступление менархе, обильные менструации, низкий индекс массы тела, отсутствие родов в анамнезе, высокая частота медицинских аборт, наличие экстрагенитальных и гинекологических заболеваний.

Половые стероиды, являясь физиологическими регуляторами клеточной пролиферации эндометрия, играют ключевую роль в патогенезе развития эндометриоза. Наблюдается дисбаланс активности ферментов, которые участвуют в метаболизме эстрогенов и прогестерона, в результате чего происходит усиление пролиферативных влияний локального эстрадиола и снижение концентрации прогестерона, выполняющего защитную роль [2].

Диагностика эндометриоза до сих пор полностью не изучена и представляет определенные трудности, так как не всегда удается выявить заболевание на ранних

стадиях его проявления. Международные литературные данные в этой области подтверждают, что диагноз зачастую устанавливают с опозданием на несколько лет [32, 33].

Симптомы заболевания достаточно часто начинаются в молодом возрасте. Около двух третей женщин с эндометриозом сообщают о симптомах, возникающих до 20 лет [34, 35]. Все большее количество исследований показывают, что тяжелые формы эндометриоза и глубокий инфильтративный эндометриоз достаточно распространены среди подростков. Почти 50% подростков, у которых эндометриоз диагностируется во время лапароскопии, имеют тяжелую форму заболевания [36,37]. Наиболее распространенной локализацией эндометриоза у подростков являются яичники, Дугласово пространство, задние листки широких связок, крестцово-маточные связки [38].

Минимальный промежуток времени от начала менархе до формирования эндометриоза, требующего хирургического вмешательства, составляет 4 года [39]. В Великобритании время от появления болевого синдрома до постановки диагноза достигает, в среднем, 6,8 лет, в Австралии – 1,5 года, а в Соединенных Штатах Америки составляет 11,7 лет [40]. Эти данные показывают, что даже в странах с развитой экономикой и высоким уровнем жизни, где используются передовые медицинские технологии, эндометриоз диагностируется с запозданием [2].

В настоящее время единственным способом достоверного подтверждения диагноза и установления степени распространенности заболевания считается хирургическое вмешательство, однако женщины репродуктивного возраста вряд ли будут согласны на операцию только в диагностических целях, особенно если они могут на время ослабить симптомы с помощью лекарственных препаратов.

Поэтому в последние годы ведется поиск неинвазивных и специфических маркеров эндометриоза, которые могут быть использованы как для скрининга и выявления рецидивов эндометриоза, так и для разработки новых методов терапии этого заболевания. Ученые во всем мире изучают перспективные молекулярные маркеры, которые участвуют в предполагаемых механизмах развития эндометриоза для своевременной диагностики и профилактики заболевания [41, 42, 43].

Важным открытием XXI века явилось исследование свойств и биологического эффекта нового класса соединений – микроРНК. Обнаружено, что эти молекулы играют ключевую роль в регуляции активности генов и их продуктов на посттранскрипционном уровне [41, 42].

МикроРНК – это класс коротких нуклеотидных последовательностей, включающий в себя 21–27 нуклеотидов РНК. Они не участвуют в синтезе белка, но задействованы в регуляции экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Впервые микроРНК были открыты R.C. Lee, R.L. Feinbaum и V. Ambros в 1993 г. [42, 43, 44, 45]. Ученые выявили, что количество белка LIN-14, использованного в развитии нематоды *Caenorhabditis elegans*, регулировалось коротким РНК-продуктом гена *lin-4* [46].

На данный момент анализ базы данных miRBase установил, что у человека определяется около 2216 зрелых молекул микроРНК, регулирующих функциональную активность генома [43]. Но эти данные значительно меняются из-за совершенствования методов диагностики и выявления новых функций найденных молекул. Как правило, микроРНК поражают до 60% генома человека [47, 48]. Ученые выявили несколько типов микроРНК, регистрируемых в эндометрии и в очагах наружного генитального эндометриоза, но они не пришли к единому мнению в отношении того, какие именно микроРНК наиболее стабильны при этом заболевании, так как измененную экспрессию одних микроРНК, которую выявляют ряд исследователей, не всегда подтверждают другие [49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57].

МикроРНК-200b – наиболее часто встречаемый тип дифференциально экспрессирующихся микроРНК, относится к семейству генов микроРНК-200 и может быть связан с патогенезом наружного генитального эндометриоза, так как принимает участие в миграции и эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток [58].

Многие исследователи описали микроРНК-196b с геномной локализацией между генами NOXA9 и NOXA10. Выявлено, что микроРНК-196, микроРНК-196a и микроРНК-196b регулируют гены из группы NOX-кластеров, например, NOXA5,

НОХВ7, НОХВ8, НОХС8 и НОХА10. По данным исследователей, гены из группы НОХ-кластеров регулируют функции эндометрия, и возможно, что экспрессия этих генов зависит от фазы менструального цикла с достижением максимального пика во время окна имплантации. Установлено участие микроРНК-196b в процессах тканевой васкуляризации и регенерации раневой поверхности при травмах, воспалениях или других патологических состояниях [52], а также выявлена ее возможная роль в патогенезе эндометриоза и в возникновении бесплодия, связанного с ним.

В ряде исследований, изучавших экспрессию таких типов микроРНК, как микроРНК-199а [53], микроРНК-126 [54], микроРНК-23а, микроРНК-23b [55], микроРНК-29с и микроРНК-451 [56] в эндометрии у пациенток с эндометриозом по сравнению с группой контроля, выявлена повышенная экспрессия микроРНК-202 [57] и незначительные изменения в экспрессии микроРНК-143 и микроРНК-145 [59]. Также в эндометрии у пациенток с эндометриозом были выявлены достоверно высокие уровни микроРНК-135а и микроРНК-135b. Однако при сравнении тканей, полученных от пациенток с эндометриозом и от женщин контрольной группы, обнаружено, что микроРНК-135а дифференцированно экспрессируется только в пролиферативной фазе менструального цикла. Следовательно, на экспрессию микроРНК-135а может влиять фаза менструального цикла [60].

Kent и другие исследователи выполнили поиск молекулярных маркеров наружного генитального эндометриоза в крови. В результате авторы выявили три типа микроРНК из семейства генов микроРНК-200 (микроРНК-200а-3p, микроРНК-200b-3p и микроРНК-141-3p) у пациенток с эндометриозом и установили, что микроРНК-200а-3p и микроРНК-141-3p можно использовать для неинвазивной диагностики наружного генитального эндометриоза [61, 62].

В результате многолетних исследований изучены различные механизмы возникновения эндометриоза, однако методы ранней неинвазивной диагностики и эффективные схемы лечения до сих пор отсутствуют.

1.2 Классификация эндометриоза

В настоящее время не существует единой универсальной классификации эндометриоза. В ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» используют клинико-анатомическую классификацию эндометриоза тела матки, эндометриозных кист яичников и ретроцервикального эндометриоза, предусматривающую выделение 4 стадий распространения заболевания, которые определяют тактику лечения и объем оперативного вмешательства [64].

Для эндометриозных кист яичников [19]:

стадия I – мелкие точечные эндометриозные очаги на поверхности яичников, брюшине Дугласова пространства без образования кистозных полостей;

стадия II – эндометриозная киста одного яичника размером не более 5–6 см с мелкими эндометриозными гетеротопиями на брюшине малого таза; незначительный спаечный процесс в области придатков матки без вовлечения кишечника;

стадия III – эндометриозные кисты яичников с двух сторон (диаметр кисты одного яичника более 5-6 см и наличие эндометриомы небольших размеров с противоположной стороны); эндометриозные гетеротопии малых размеров на париетальной брюшине; выраженный спаечный процесс в области придатков матки с частичным вовлечением кишечника;

стадия IV – эндометриозные кисты яичников с двух сторон более 6 см с переходом патологического процесса на мочевой пузырь, прямую и сигмовидную кишку; выраженный спаечный процесс.

Для эндометриоза ретроцервикальной локализации [63]:

стадия I – эндометриозные очаги расположены в пределах ректовагинальной клетчатки;

стадия II – прорастание эндометриозной ткани в шейку матки и стенку влагалища с образованием мелких кист, в серозный покров ректосигмоидного отдела и прямой кишки;

стадия III – распространение патологического процесса на крестцово-маточные связки, серозный и мышечный покров прямой кишки;

стадия IV – вовлечение в патологический процесс слизистой оболочки прямой кишки с переходом на брюшину прямокишечно-маточного пространства с образованием спаечного процесса в области придатков матки.

Одной из наиболее широко применяемых в мировой практике стала предложенная в 1979 году Американским обществом фертильности (с 1995 года – Американское общество по репродуктивной медицине) и пересмотренная в 1996 году классификация, основанная на подсчете общей площади поражения в баллах:

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

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

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

IV стадия – тяжелый эндометриоз (более 40 баллов).

Однако данная классификация не предусматривает наличия и распространения инфильтративных форм.

1.3 Клиническая картина и современные методы диагностики наружного генитального эндометриоза

Наиболее значимыми клиническими симптомами эндометриоза являются: дисменорея, диспареуния, дисхезия, хроническая тазовая боль (ХТБ), бесплодие, нарушения менструального цикла и аномальные маточные кровотечения [26, 66, 67].

Хроническая тазовая боль, вызванная эндометриозом, часто бывает изнурительной, вызывает чувство безысходности, усталость и депрессию, тем самым значительно ухудшая качество жизни женщин [68, 69, 70].

На ранних стадиях эндометриоз, как правило, протекает бессимптомно, в связи с чем его диагностика на начальных этапах затруднена, чаще всего из-за отсутствия специфических симптомов и чувствительных молекулярных биомаркеров [68]. На сегодняшний день единственным методом доклинической неинвазивной диагностики наружного генитального эндометриоза считается определение в крови уровня маркера СА-125. Однако СА-125 (менее 35 МЕ/мл) не

является специфическим маркёром, характерным только для эндометриоза, что ограничивает применение данного теста в клинической практике [2, 71].

При первичной диагностике обращают на себя внимание жалобы преимущественно на периодические или хронические тазовые боли, дисменорею, при которых возникает необходимость однократного или постоянного приема анальгетиков, а также бесплодие длительностью более года при наличии регулярного менструального цикла и полового партнера с нормальными показателями спермограммы. Многолетние исследования доказали, что клинические проявления эндометриоза наблюдаются только на III-IV стадиях развития заболевания [2].

На начальном этапе наиболее важным методом диагностики является двуручное гинекологическое исследование, которое позволяет выявить опухолевидное образование в области придатков матки, наличие инфильтратов ретроцервикальной области, а также болезненность стенок малого таза во время пальпации.

Ультразвуковое исследование органов малого таза – это самый распространённый метод диагностики и динамического наблюдения пациенток с эндометриозом [2, 19, 72]. УЗИ является необходимым для диагностики эндометриом яичников и глубокого инфильтративного эндометриоза с вовлечением стенок кишечника, мочевого пузыря или мочеоточника, даже в том случае, когда гинекологический осмотр не выявил патологии [67, 79].

Характерными эхографическими признаками эндометриом яичников являются наличие не смещаемой мелкодисперсной взвеси средней или повышенной эхогенности; расположение кисты позади и сбоку от матки; утолщение капсулы кисты; двойной контур образования; неравномерность стенки; и отсутствие кровотока внутри образования по данным цветового доплеровского картирования (ЦДК) [2, 72].

Однако УЗИ остается малоинформативным для диагностики поверхностных очагов эндометриоза, расположенных на брюшине малого таза и на связочном аппарате, вследствие низкой разрешающей способности, что в свою очередь

снижает частоту решения проблем у пациенток с жалобами на болевой синдром [2, 23, 24, 71].

За последние годы в диагностике эндометриоза особую ценность приобрёл неинвазивный метод исследования – магнитно-резонансная томография [2, 73, 74]. Несмотря на высокую стоимость данного метода, МРТ является наиболее точным для выявления эндометриоидных инфильтратов и даже позволяет выявлять очаги, расположенные субперитонеально. Также к преимуществам данного метода диагностики можно отнести возможность оценки переднего, среднего и заднего отделов малого таза в одном исследовании [2, 73, 75]. Таким образом, диагностическая чувствительность МРТ при глубоком инфильтративном эндометриозе составляет 90,3%, специфичность – 91,0% [2].

Для диагностики эндометриоза мочевыделительной системы наиболее информативным методом является рентгенологическое исследование [2, 76, 77, 78, 80, 81]. С помощью урографии возможно диагностировать эндометриоидные поражения мочеточников [16].

В настоящее время для диагностики эндометриоза мочевого пузыря применяется цистоскопия [16, 78, 92]. Наиболее часто очаги эндометриоза локализуются на задней стенке мочевого пузыря или в области треугольника Льюто [80]. Для постановки диагноза при выполнении цистоскопии производят прицельную биопсию слизистой оболочки мочевого пузыря в месте его поражения [81]. Детальное исследование на наличие поражения мочевой системы целесообразно проводить при распространении эндометриоидного инфильтрата на клетчатку параметрия, что чаще всего происходит при локализации эндометриоза в ретроцервикальной области [24, 83, 84].

При распространенных формах наружного генитального эндометриоза, а также при наличии патологического процесса в ретроцервикальной клетчатке необходимо определить наличие поражения толстой кишки [78, 85, 86]. Применяются различные методы диагностики: ирригоскопия, ректороманоскопия и колоноскопия [2, 77]. Наиболее точно верифицировать диагноз позволяет

биопсия слизистой оболочки кишечника при выполнении эндоскопических исследований [5, 78, 87, 88].

Золотым стандартом в диагностике эндометриоза на сегодняшний день является лапароскопия с прицельной биопсией и последующим гистологическим исследованием удаленных патологических тканей [2, 17]. Учитывая, что данный метод является инвазивным, пациентки зачастую отказываются от проведения оперативного лечения, в связи с чем постановка диагноза откладывается на несколько лет от момента возникновения первоначальных симптомов заболевания [2, 8, 91, 92].

При выполнении лапароскопии невозможно выявить все эндометриоидные гетеротопии из-за их небольших размеров или расположения [71, 89]. Так, в 21% случаев очаги эндометриоза локализуются субперитонеально и выявляются лишь при микроскопическом исследовании [15, 26, 88, 90]. Этим объясняется тот факт, что даже при наличии клинических симптомов эндометриоза в 23% случаев его не удается верифицировать при проведении диагностической лапароскопии [16, 24, 82].

Необходимо отметить, что после хирургического лечения эндометриоза сохраняется вероятность возникновения рецидива заболевания, частота которого велика и составляет около 21% в течение первых 2 лет, 47% через 5 лет и 55% вплоть до 7 лет наблюдения [71, 76, 93, 94]. Риск рецидива в основном зависит от распространения патологического процесса и радикальности иссечения гетеротопий, а также наличия и качества лечения после операции.

1.4 Факторы риска развития рецидива наружного генитального эндометриоза

Несмотря на большое количество исследований, остается актуальным вопрос о поиске предикторов раннего рецидива заболевания. В ходе оперативного лечения не всегда удается иссечь глубокие инфильтративные поражения, а также заметить очаги небольших размеров [66, 77, 86, 89], поэтому эффективность проведенного лечения зависит от удаления всех видимых гетеротопий и микроскопических

имплантатов. Возникновение рецидива связано с ростом очагов или клеток *in situ*, которые были не полностью удалены во время операции, или с развитием очагов *de novo*, вследствие возобновления влияния пусковых факторов [2, 95, 96, 98].

В зависимости от локализации наружного генитального эндометриоза была изучена частота возникновения рецидива заболевания. Busacca и его коллеги провели исследование, включившее 1106 женщин с лапароскопически подтвержденным эндометриозом, в результате которого рецидив заболевания был диагностирован у 144 женщин спустя 4 года после операции. Процент рецидива для поверхностных эндометриозидных очагов яичников составил 24,5%, очагов брюшины малого таза – 17,8%, эндометриозидных кист яичников – 30,6% и 23,7% для глубокого инфильтративного эндометриоза [94]. Авторами было установлено, что процент рецидива заболевания увеличился через 8 лет до 42%; 24,1%; 43,4% и 30,9%, соответственно [98, 99].

Jones и Sutton обнаружили, что рецидив при двусторонних эндометриозидных кистах яичников возникает чаще, чем при односторонних [93, 100]. Также имеются данные о том, что у женщин с эндометриозидными кистами яичников более 6 см возрастает риск повторного оперативного вмешательства [101, 102]. Отмечено, что чем тяжелее исходная степень распространения эндометриоза, тем чаще впоследствии возникнет рецидив заболевания. Ehasoustos и соавторами [103] было продемонстрировано, что частота возникновения рецидива через 2 года при I и II стадиях заболевания – 5,7%, а при III-IV стадиях процент рецидива увеличился почти в 3 раза и составил 14,3%.

В связи с этим оправдан поиск достоверных, чувствительных и специфичных биомаркеров для ранней неинвазивной диагностики эндометриоза, которые позволят выявлять и прогнозировать возникновение рецидива заболевания на доклиническом этапе, а также определять возможную тактику ведения этих пациенток.

1.5 Тактика ведения и лечения женщин репродуктивного возраста с наружным генитальным эндометриозом

Наиболее эффективным методом купирования болевого синдрома у женщин репродуктивного возраста с эндометриозом является хирургическое лечение [2, 68, 85, 88].

По мнению Л.В. Адамян, оперативное лечение проводится не только для удаления очагов эндометриоза и установки диагноза, но и для выбора дальнейшей тактики ведения пациенток и назначения противорецидивной терапии в послеоперационном периоде [20, 104, 105].

Определение гормонального препарата и продолжительность его применения зависят в первую очередь от предъявляемых жалоб пациентки, степени распространенности процесса по данным лапароскопии, а также от возраста и репродуктивных планов женщины [10, 17, 106].

При сравнении лекарственных препаратов для лечения эндометриоза выявлена их одинаковая терапевтическая эффективность, однако длительность применения значительно отличалась [107]. Продолжительность использования гормональных препаратов является важным критерием для выбора терапии у женщин репродуктивного возраста, что подтверждается рядом исследований [8, 17, 71, 75, 80, 82, 84, 85, 87, 97, 101, 107].

В качестве терапии первой линии у пациенток с эндометриозом рекомендована монотерапия гестагенами [109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117]. Также используют прогестагены в непрерывном режиме для обеспечения атрофии железистого эпителия и децидуализации стромального компонента, а у пациенток с эндометриозом, которые планируют беременность, возможно применение их в циклическом режиме.

После хирургического лечения для профилактики рецидива заболевания и с целью контрацепции рекомендовано применение комбинированных оральных контрацептивов (КОК) [118, 119, 120, 121].

Пациенткам с распространенными и инфильтративными формами эндометриоза при установленном диагнозе или после хирургического лечения рекомендовано назначение агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ) [122, 123, 124, 125, 126]. Эти препараты в большинстве случаев позволяют восстановить репродуктивную функцию без радикальных вмешательств, повышают эффективность оперативного лечения и улучшают качество жизни женщин [10, 127]. Существуют различные способы их введения: внутримышечный, подкожный и интраназальный. В результате отмены терапии происходит Rebound-эффект – активация гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, что приводит к стимуляции овуляции, и вероятность наступления самопроизвольной беременности повышается [105, 127, 128].

Известно, что назначение аГнРГ пациенткам с эндометриозом на 3-6 месяцев перед проведением процедуры вспомогательных репродуктивных технологий значительно повышает шансы наступления беременности [129, 130, 131, 132].

Пациенткам с жалобами на меноррагии, у которых подтвержден эндометриоз, и они не заинтересованы в репродуктивной функции, рекомендовано использовать левоноргестрел - выделяющую внутриматочную систему (ВМС-ЛНГ) [133, 134, 135, 136, 137, 138]. Данную систему возможно использовать в течение 5 лет, после чего ее необходимо заменить на новую, для продолжения терапии.

Следует отметить, что в настоящее время наружный генитальный эндометриоз остается не только актуальной проблемой медицины, а также является социально значимым заболеванием нашей цивилизации.

Поэтому приоритетным направлением развития биомедицинской науки является поиск маркеров, предоставляющих возможность детализации молекулярных механизмов развития патологических процессов, разработки алгоритмов для диагностики и контроля лечения.

1.6 Биомаркеры развития эндометриоза

До сих пор продолжается поиск молекулярных маркеров, которые можно было бы использовать в качестве малоинвазивных тестов для диагностики эндометриоза. Проведенные исследования в этой области установили, что имеются достоверные различия молекулярного состава эндометриоидных очагов, эутопического эндометрия у женщин с эндометриозом и без него [76].

Одним из первых диагностических маркеров был гликопротеин СА-125, однако до сих пор до конца не изучен механизм его повышения. Считается, что эндометриоидные гетеротопии содержат большое количество СА-125 по сравнению с нормальным эндометрием, а воспаление, которое сопутствует эндометриозу, способствует повышению этого маркера в крови [115]. Однако доказано, что повышение СА-125 в периферической крови у здоровых женщин также наблюдается во время менструации, при воспалительных процессах в придатках, доброкачественной гиперплазии эндометрия и серозном раке яичников [17]. Чувствительность метода определения данного гликопротеина в качестве диагностического маркера составляет не более 70%, что ограничивает его использование в клинике [71, 140]. Также анализ данных литературы показывает, что концентрация СА-125 в периферической крови увеличивается только на поздних стадиях заболевания, а на ранних стадиях уровень этого маркера остается в пределах нормальных значений [2, 141].

Проводятся многочисленные исследовательские работы, направленные на поиск молекулярных биомаркеров эндометриоза в образцах крови, мочи и эндометрии. Изучаются представители различных классов молекул, такие как гликопротеины, цитокины, факторы роста, кодирующие и не кодирующие РНК-транскрипты (мРНК, микроРНК), нейрональные белки и метаболиты [7, 140, 142, 143]. В различных источниках литературы обнаружено более 120 потенциальных молекулярных маркеров, изменение экспрессии которых выявлено в тканях и биологических средах при эндометриозе. Однако остаются актуальными

дальнейшие исследования для использования этих данных с целью разработки эффективного диагностического теста.

Биомаркеры эндометриоза в крови

Как было указано ранее, в качестве одного из первых потенциальных диагностических маркеров в периферической крови рассматривался гликопротеин СА-125. Этот белок продуцируется клетками эндометрия и мезотелиальными клетками и в ответ на воспаление выделяется в кровь через эндотелий сосудов. Помимо определения уровня СА-125 проводились исследования комбинации маркеров, в состав которой также входил данный гликопротеин. В результате обнаружено, что содержание в периферической крови СА-125 в совокупности с рядом цитокинов, ангиогенных факторов и факторов роста изменяется у женщин с эндометриозом при сравнении с контрольной группой. Однако полученные комбинации маркеров требуют дополнительной валидации, поскольку результаты исследования до сих пор не используются в практике.

Для диагностики эндометриоза также были изучены онкомаркеры СА-19-9, СА-15-3 и СА-72, которые показали более низкую специфичность по сравнению с СА-125.

В качестве молекулярных маркеров предлагались и другие гликопротеины плазмы крови. Выявлено, что уровень гликоделина-А повышается в крови у женщин при III-IV стадиях заболевания, а также у пациенток с эндометриоидными кистами яичников [144]. Кроме того, считается, что этот белок, выявленный в эндометрии, обладает ангиогенным, иммуносупрессивным и контрацептивным эффектом, может способствовать развитию эндометриоза и связанного с ним бесплодия. Также гликоделин не только продуцируется и выделяется клетками железистого эпителия эндометрия, но и секретируется очагами эндометриоза в перитонеальную жидкость и кровь. Эти данные подтверждают результаты исследования, которые показали повышение уровня гликоделина в плазме крови у женщин с эндометриозом [144].

Рядом авторов установлено, что достоверным маркером для диагностики легкой и умеренной стадии эндометриоза можно считать Аннексин V, который отвечает за апоптоз клеток. Известно, что нарушения в регуляции апоптоза в эутопическом и эктопическом эндометрии у женщин с эндометриозом могут способствовать выживанию клеток эндометрия в малом тазу и развитию эндометриоидных гетеротопий. Аннексин V включен в группу достоверных неинвазивных маркеров для диагностики эндометриоза [145].

Молекулы клеточной адгезии интегрального мембранного белка (ICAM) регулируют взаимодействия между клетками и обеспечивают адгезию и инвазию клеток эндометрия в новой локализации. Увеличение экспрессии этих белков обнаружено в клетках эктопического эндометрия [140]. В крови у женщин с эндометриозом отмечалось изменение содержания ICAM-1, однако рядом исследователей получены противоречивые данные относительно зависимости его содержания от стадии эндометриоза. Тем не менее, ICAM-1 включен в панель исследования его в качестве маркера заболевания [142]. Данные о диагностической значимости этой молекулы противоречивы: одни ученые обнаружили повышение, а другие – снижение уровня sICAM-1 в плазме/сыворотке крови у женщин с эндометриозом по сравнению с женщинами из группы контроля. Во многих публикациях отмечено достоверное повышение уровня хемокина CXCL8 у пациенток с эндометриомами яичников по сравнению с пациентками контрольной группы [17], тогда как в других исследованиях статистически значимых различий в экспрессии этого белка не отмечалось [7].

Выявлена значимая роль матриксных металлопротеиназ (ММР) в патогенезе эндометриоза. В ряде работ установлено повышение уровня металлопротеиназ ММР-2 и ММР-9 в крови у женщин с эндометриозом, а также увеличение экспрессии микроРНК (мкРНК) и ММР-3 [143].

В процессе регуляции ангиогенеза важным компонентом является VEGF, кроме того, этот фактор способствует развитию эндометриоидных очагов [142]. Определение уровня VEGF в периферической крови показало его значимость в диагностике эндометриоза [48, 144].

Также в качестве возможных маркеров рассматривались различные гормоны, такие как пролактин, эстроген, прогестерон, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны. Выявлены их значительные изменения в крови пациенток с эндометриозом [145]. Несмотря на высокую специфичность при сравнении исследуемых групп, полученные данные показали низкую чувствительность, в связи с чем в настоящее время не рекомендуется исследовать гормоны с целью диагностики эндометриоза.

МикроРНК (miRNAs)

Представляет особый интерес изучение роли микроРНК в патогенезе и диагностике заболеваний. МикроРНК представляют собой эндогенные, короткие, не кодирующие белок молекулы РНК длиной 21-24 нуклеотида, которые свойственны всем многоклеточным организмам и регулируют экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне за счет связывания с комплементарными последовательностями мРНК-мишени [151].

Результаты недавних исследований демонстрируют, что нарушение экспрессии микроРНК играет важную роль в патогенезе эндометриоза, так как эти молекулы обладают способностью контролировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [152, 153, 154, 155, 156]. МикроРНК взаимодействуют с транскриптами матричной РНК и регулируют экспрессию генов на уровне трансляции, в результате чего останавливается синтез соответствующих белков. В ходе проведенных работ выявлено, что микроРНК участвуют практически во всех процессах жизнедеятельности клетки [43, 44, 157, 158, 159], в связи с чем, нарушение экспрессии микроРНК может приводить к изменению экспрессии регулируемых ими белков и в последующем к нарушению функции клеток. Поэтому изучение экспрессии микроРНК при эндометриозе является перспективным подходом для установки патогенетических механизмов этого заболевания. МикроРНК остаются стабильными в кровотоке, так как секретируются в кровь в составе различных микровезикул, в частности экзосом,

которые защищают их от действия нуклеаз. Соответственно, экспрессируемые микроРНК можно рассматривать в качестве достоверных диагностических маркеров для диагностики эндометриоза [160].

Биомаркеры эндометриоза в эктопическом и эутопическом эндометрии

В последние годы активно изучается роль малых некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов. В ряде исследований установлено, что только 2-3% человеческого генома транскрибируется в мРНК с дальнейшей трансляцией и образованием функциональных белков [161]. В связи с этим белок-некодирующие РНК (нкРНК) явились объектом для прицельного изучения. Так, в ряде работ была продемонстрирована ключевая роль нкРНК в патогенетических механизмах формирования и прогрессирования пролиферативных заболеваний, в частности эндометриоза [162]. Некодирующие РНК классифицируются в зависимости от длины нуклеотидной цепи на длинные и малые нкРНК. Длинные нкРНК включают РНК транскрипты с числом нуклеотидов более 200 [163]. Представители малых нкРНК достаточно гетерогенны, и представлены несколькими разновидностями: микроРНК, транспортные РНК, малые ядрышковые РНК, короткие интерферирующие РНК, рибосомальные РНК и РНК, взаимодействующие с Piwi-белками (пивиРНК) [164]. Наиболее изученными на сегодняшний день являются различные представители семейств микроРНК и длинных нкРНК, установлена их потенциальная роль в регуляции экспрессии генов-мишеней, участвующих в развитии пролиферативных заболеваний. В меньшей степени исследованы пивиРНК и их ассоциация с различными патологиями, в этой связи в настоящее время проводятся активные исследования биологической роли этих коротких транскриптов в генезе заболеваний человека.

Семейство пивиРНК представлено одноцепочечными РНК, имеющими длину 23-36 нуклеотидов и взаимодействующими с белками семейства PIWI с образованием комплекса piRISC (piRNA-induced silencing complex). Долгое время считалось, что

основной биологической функцией пивиРНК является контроль экспрессии транспозонов в делящихся клетках при эмбриогенезе и гаметогенезе [165]. Поскольку перемещение транспозонов имеет высокий риск повреждения генома, регуляция их экспрессии пивиРНК имеет важное значение для поддержания нормального гаметогенеза и размножения. Благодаря разнообразию исходных транспозонов, пивиРНК являются самым большим по численности классом среди нкРНК [166, 167].

Согласно имеющимся базам данных, в геноме человека идентифицировано около 23 439 piRNA, что вполне сопоставимо с числом кодирующих белок мРНК (~20 000), но значительно превышает общее число таких нкРНК, как микроРНК (~2000) [168, 169], что позволило предположить, что пивиРНК могут выполнять более разнообразные биологические функции. Так, было установлено, что помимо участия в процессах сперматогенеза и регуляции экспрессии транспозонов, пивиРНК играют роль в эпигенетической регуляции и перестройках генома, регуляции синтеза белка и поддержании активности стволовых клеток зародыша [168]. Кроме того, недавно сообщалось об aberrантной экспрессии пивиРНК и белков семейства PIWI в некоторых раковых опухолях человека, причем было показано, что некоторые комплексы пивиРНК с PIWI-белками участвуют в опухолевом процессе и их экспрессия может быть использована для прогнозирования исходов заболевания [170, 171]. Анализ экспрессии пивиРНК может предоставить ценные данные для уточнения патогенетических механизмов эндометриоза.

Произведено сравнение состава микроРНК в эктопическом и эутопическом эндометрии, в результате обнаружены значительные отличия их экспрессии в исследуемых тканях. Выявлено повышение уровня miR-17-5p, miR-23a/b, miR-542-3p; miR-9, miR-34 и miR-21 в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом по сравнению с пациентками контрольной группы [172, 173]. Также в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом в обе фазы менструального цикла отмечено повышение экспрессии miR-135b [175]. Полученные данные указывают на значимый вклад эпигенетической регуляции микроРНК в патогенетические процессы, связанные с эндометриозом.

Стоит отметить, что описанные исследования выполнены на небольшой

выборке, поэтому необходимо подтверждение полученных результатов с большим количеством наблюдений. Таким образом, обнаруженные различия показали перспективность выявления микроРНК в крови для диагностики эндометриоза. Представленные результаты исследований указывают не только на важную роль микроРНК в патогенезе эндометриоза, но и на потенциальную возможность использования информации об их экспрессии в диагностических целях.

Суммируя данные литературы, следует отметить, что на сегодняшний день наружный генитальный эндометриоз является болезнью цивилизации и имеет не только медицинское, но и социальное значение. Сложившаяся ситуация определяет актуальность поиска новых молекулярных маркеров для диагностики различных форм наружного генитального эндометриоза на начальных стадиях заболевания.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Клинико-лабораторные методы исследования

Материалы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор, д.м.н. Г.Т. Сухих).

В зависимости от локализации наружного генитального эндометриоза 100 исследуемых пациенток были разделены на две группы: I группа включала в себя 55 пациенток с эндометриоидными кистами яичников (ЭКЯ), II группа – 45 пациенток с ретроцервикальным эндометриозом (РЦЭ).

Группу контроля составили 30 пациенток без эндометриоза (группа сравнения). В нее были включены пациентки, прооперированные по поводу трубно-перитонеального фактора бесплодия, обусловленного спаечным процессом в малом тазу, и у которых по данным гистологического заключения подтверждено отсутствие патологических изменений в эндометрии.

Все женщины были прооперированы в гинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (заведующий – академик РАН Л.В. Адамян) в период с 2017 по 2019 гг.

Критерии включения: возраст пациенток 24-37 лет, наличие эндометриоидных кист яичников или ретроцервикального эндометриоза, отсутствие тяжелой сопутствующей соматической патологии, наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: возраст женщин моложе 24 лет и старше 37 лет, злокачественные новообразования в анамнезе, нарушение менструального цикла в анамнезе, прием гормональных препаратов в течение последних 6 месяцев до операции.

Дизайн исследования представлен на схеме. Проведено одномоментное исследование в параллельных группах.



Группы:

I – пациентки с эндометриоидными кистами яичников.

II – пациентки с ретроцервикальным эндометриозом.

III – пациентки с отсутствием наружного генитального эндометриоза (группа контроля).

Конечные точки исследования:

1. Сравнение экспрессии микроРНК в тканях эндометриоидных кист яичников и ретроцервикальных гетеротопиях в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.

2. Сравнение экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии больных эндометриозом относительно группы контроля в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.

3. Определение влияния фазы менструального цикла на экспрессию микроРНК в исследуемых тканях эндометрия.

4. Проведение анализа молекулярного состава малых РНК и белков в тканях и стромальных клетках.

Хирургическое лечение проводили под эндотрахеальным наркозом. Объем операции зависел от степени распространения эндометриоза. Проводили резекцию яичников и иссечение эндометриодных гетеротопий в пределах визуально здоровых тканей, гистероскопию и отдельное диагностическое выскабливание эндоцервикса и эндометрия с последующим гистологическим исследованием операционного материала.

Экспрессию малых РНК оценивали с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения на платформе Illumina (NextSeq) и методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Протеомное исследование состава белков стромальных клеток эндометрия проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Обработку данных транскриптомного и протеомного профилирования проводили при помощи биоинформационных программных пакетов и баз данных. Также анализ полученных данных проводился с использованием статистических программ StatSoft Statistica V10, SPSS Statistics 22 и R v.3.5.

Клинические методы исследования

При поступлении в стационар изучали анамнез и жалобы больных: присутствие болевого синдрома, связь его с менструальным циклом, наличие бесплодия; анализировали перенесенные острые и хронические экстрагенитальные и гинекологические заболевания, семейный анамнез, возраст менархе, характеристики менструального цикла, количество беременностей, их течение и исходы. Особое внимание придавалось изучению репродуктивной функции: паритет, течение и исходы беременностей, количество аборт и беременностей, закончившихся выкидышами, наличие бесплодия и попытки ЭКО в анамнезе, причины бесплодия. Подробной оценке подвергались ранее перенесенные хирургические вмешательства.

Перед оперативным лечением проводили полное клинико – лабораторное обследование, которое включало в себя: общий осмотр, оценку телосложения,

определение состояния сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной, эндокринной, мочевыделительной и пищеварительной систем, молочных желез. При гинекологическом обследовании проводили осмотр наружных половых органов, влагалища и шейки матки в зеркалах, также выполняли бимануальное влагалищное исследование и ректо-вагинальное исследование по показаниям.

Лабораторные методы исследования

До госпитализации и во время проведения предоперационной подготовки, а также в постоперационном периоде выполняли контроль параклинических данных. Исследования включали в себя: определение группы крови и Rh- фактора, общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, гемостазиограмму, исследование крови на наличие сифилиса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита (В, С). Пациентам брали мазки на флору для определения степени их чистоты, проводилось цитологическое исследование мазков экзо- и эндоцервикса.

Инструментальные методы исследования

Всем женщинам было проведено ультразвуковое исследование органов малого таза, которое проводилось в отделении ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель отделения – д.м.н., профессор А.И. Гус) с помощью приборов GE Volusion E8 (Австрия), Medison Accuvix A30 (Южная Корея), при использовании трансабдоминального и трансвагинального датчиков 3,5 и 5,0 МГц.

Также выполняли рентгенографию органов грудной клетки, электрокардиографию, по показаниям проводилось ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек и щитовидной железы.

Перед хирургическим лечением все пациентки были осмотрены врачом-терапевтом и врачом-анестезиологом, а также другими специалистами (врачом-

эндокринологом, врачом-кардиологом, врачом-офтальмологом, врачом-неврологом) при необходимости.

Интенсивность болевого синдрома оценивали в баллах (от 0 до 10) по методике субъективной оценки боли – Визуальная аналоговая шкала (ВАШ) (Huskisson E.C., 1974), которая представляет собой отрезок прямой линии длиной 10 см, на одном конце (слева) которого отмечена точка отсутствия боли (0 баллов), а на другом конце (справа) – нестерпимая боль (10 баллов) (Приложение 1).

Хирургическое лечение и ведение послеоперационного периода

Хирургическое лечение выполняли в условиях эндотрахеального наркоза по стандартной закрытой методике.

После опорожнения мочевого пузыря при горизонтальном положении пациентки на спине в брюшную полость вводили иглу Вереща через разрез в области пупка и с помощью инсуффлятора Endoflator (Karl Storz GmbH & Co., Германия) осуществляли наложение пневмоперитонеума с давлением до 12 мм.рт.ст. Для создания пневмоперитонеума использовался углекислый газ. После наложения пневмоперитонеума через тот же разрез вводили троакар диаметром 11 мм (Karl Storz GmbH & Co., Германия). После извлечения стилета в гильзу троакара вводили лапароскоп Hopkins II (0o) (Karl Storz GmbH & Co., Германия), соединенный с источником света и эндовидеокамерой. Пациентку переводили в положение Тренделенбурга (20-30o). Для вторичных проколов брюшной стенки использовали 5 мм троакары (Apple Medical Corp., США, ООО Апекс Мед, Россия или Karl Storz GmbH & Co., Германия). В данной работе использовалось оборудование и инструменты фирмы «Karl Storz» (Германия).

Объем оперативного вмешательства определялся степенью распространения эндометриоза. Проводили резекцию яичников и иссечение очагов эндометриоза в пределах визуально здоровых тканей, гистероскопию и отдельное диагностическое выскабливание эндоцервикса и эндометрия с последующим гистологическим исследованием операционного материала.

Состояние пациентки после оперативного лечения оценивали с помощью параклинических данных. Послеоперационный период протекал без осложнений. Всем пациенткам проводилась антибиотикопрофилактика до 3-5х послеоперационных суток, профилактика тромбоэмболических осложнений, ранняя послеоперационная физиотерапия. Выписка из стационара производилась на 5-7 сутки после операции. Женщины находились под динамическим наблюдением с контрольным послеоперационным осмотром через 1 месяц после операции с определением дальнейшей тактики ведения в зависимости от результатов гистологического исследования, клинической картины и репродуктивных планов.

Морфологическое исследование

Всем пациенткам проводили морфологическое исследование операционного материала (тканей эндометрия, капсул эндометриом яичников и очагов ретроцервикального эндометриоза) в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель отделения – д.м.н., профессор А.И. Щеголев) по стандартным методикам. Небольшие образцы ткани капсулы кисты, очага ретроцервикального эндометриоза и эутопического эндометрия были отобраны для выделения микроРНК методом секвенирования.

Статистический анализ полученных данных

С помощью таблиц Microsoft Excel и статистических программ IBM Statistica V10, SPSS Statistics 22 и R v.3.5 проводилась обработка полученных в результате проведенной работы данных с соблюдением рекомендаций для медицинских и биологических исследований. Методом вариационной статистики были обработаны все полученные клиничко-anamnestические данные. Оценивали среднее значение и среднеквадратичное отклонение для параметрических данных, медиану – для непараметрических данных, для качественных данных рассчитывали частоты (%). Для сравнения категориальных данных в группах, а также для оценки

значимых различий между ними использовали тест χ^2 . Этот тест проводили после построения таблиц сопряженности. Для оценки различий в группах применяли методы параметрической статистики (t-тест), непараметрической статистики – тест Манна - Уитни. Статистически значимыми считали различия между статистическими величинами при уровне достоверности $p < 0,05$.

2.2 Молекулярно-биологические методы исследования

Выделение стромальных клеток из тканей эндометрия

Образцы тканей для выделения стромальных клеток, а также для молекулярных исследований получали в ходе оперативных вмешательств по поводу наружного генитального эндометриоза. Забор тканей проводился с одобрения этической комиссии медицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ. Пациенты, вошедшие в исследование, давали информированное согласие на забор биоматериала. Первичные культуры стромальных клеток эндометрия получали из образцов тканей эутопического эндометрия и тканей эндометриоидных кист яичника. Полученные в ходе хирургических манипуляций ткани отмывали несколько раз в холодном стерильном физиологическом растворе, затем измельчали и далее измельченные ткани подвергали ферментативной диссоциации в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 37°C) с использованием раствора коллагеназы IA и 0,25% раствора Трипсина-ЭДТА в среде DMEM/F12 (1:1; 2мМ глутамин; 100 ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин), в течение 30 мин. для эутопического эндометрия и 120 мин. для эктопического эндометрия. Диссоциированные клетки отфильтровывали с использованием 40 мкм сита, после чего клетки осаждали центрифугированием (300g 10 мин). К осадку добавляли 10 мл среды DMEM/F12 (1:1), ресуспендировали и повторно центрифугировали. Осадок замораживали в жидком азоте.

Выделение РНК из тканей эндометрия

Образцы тканей эктопического и эутопического эндометрия получали во время хирургических операций, как в пролиферативную, так и секреторную фазу менструального цикла. Фазы цикла верифицировались по данным гистологических исследований. Полученные ткани помещали в стерильный физиологический раствор для промывки, после чего промытые образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Выделение и очистку тотальной РНК проводили при помощи наборов miRNeasy Micro Kit (Qiagen) и RNeasyMinElute Cleanup Kit (Qiagen). Концентрацию РНК определяли на флуориметре Qubit 3.0 (Invitrogen™) с использованием набора Qubit RNA assay kit. Качество суммарной РНК оценивали с использованием набора RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) методом капиллярного электрофореза на биоанализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Отбор образцов суммарной РНК проводили по следующим параметрам: соотношение концентраций рибосомальных РНК (28S и 18S) – 1,6-1,8, индекс RIN – не менее 7.

Транскриптомный анализ

Библиотеки кДНК из полученных образцов тотальной РНК готовили с использованием комплекта реагентов NEBnext Multiplex SmallRNA (New England Biolabs). Оценку качества библиотек и расчет количества осуществляли методами электрофореза на микрочипах на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) и флуориметрии на приборе Qubit (ThermoFisher). Секвенирование библиотек кДНК выполняли при помощи высокопроизводительного секвенатора NextSeq (Illumina, USA) с использованием материалов и реагентов из набора NextSeq 500/550 High Output v2 kit (Illumina, USA). По окончании секвенирования проводили контроль качества по следующим параметрам: интенсивность сигнала в каналах детекции, плотность и доля кластеров, прошедших фильтрацию, количество выровненных прочтений. Во всех исследованиях указанные параметры находились в интервалах допустимых значений.

Протеомный анализ

Для выделения белка к клеточному осадку добавляли лизирующий буфер RIPA с ингибиторами протеаз (100 мкл), после чего лизат обрабатывали ультразвуком, после чего центрифугировали 15000g 10 минут при 4°C. Супернатант осаждали 5 объемами ледяного ацетона в течении часа при -80°C. К полученному осадку добавляли раствор, содержащий 8 М мочевины, 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ DTT, pH=8,5. Осадок растворяли и наносили на фильтровальную колонку Microcon-10 (Millipore) и центрифугировали 14000 g, 15 минут. Далее на колонку наносили 100 мкл раствора 8 М мочевины, 50 мМ Tris-HCl, 50 мМ йодацетамида и инкубировали в темноте 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали 14000 g 10 минут. Затем фильтровальную колонку промывали 2 раза раствором 8 М мочевины, 50 мМ Tris-HCl, pH=8,5 при 14000 g 10 мин. После чего промывали еще два раза 100 мкл раствора 50 мМ NH₄HCO₃ (14000 g 10 минут). Далее на фильтры наносили 40 мкл 50 мМ NH₄HCO₃, содержащего трипсин (соотношение фермента к белку 1:50), и инкубировали 18 часов при 37°C. Пептиды элюировали 50 мкл ddH₂O при 14000 g в течение 15 минут. Элюат леофилизировали и растворяли в водном растворе 5% ацетонитрила и 5% муравьиной кислоты.

Хроматографическое разделение пептидов проводили с использованием системы HPLC Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США). Перед аналитическим разделением пептиды концентрировали на колонке Acclaim μ-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм; Thermo Scientific) в изократическом режиме при расходе 10 мкл/мин в течение 5 мин в подвижной фазе в (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота). Затем пептиды разделяли на колонке Acclaim Permap C18 (75 мкм × 150 мм, размер частиц 2 мкм; Thermo Scientific) в градиентном режиме элюирования. Градиент (90 мин) формировался подвижной фазой А (0,1% муравьиной кислоты) и в (80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты) при расходе 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой В в течение 5 мин; концентрацию подвижной фазы В линейно увеличивали до 35% в

течение 65 мин и до 99% в течение 5 мин. После промывки колонны (5 мин, 99% В) концентрацию подвижной фазы В снижали до исходных условий 2% подвижной фазы в течение 5 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием Q Exactive HF гибридного квадруполь-орбитального масс-спектрометра (Thermo Scientific) с использованием наноэлектроспрейного источника ионов (Thermo Scientific). Ионизирующее напряжение составляло 2,1 кВ. Панорамные MS-спектры были получены в диапазоне 400-1200 м/z; фрагментарные ионы были сканированы от m/z 100 до верхнего значения m/z, заданного зарядовым состоянием иона-предшественника, но не более 2100 м/z. Все тандемные MS-сканирования проводились на ионах с зарядовым состоянием от $z = 2+$ до $z = 6+$. Синхронный отбор предшественников способствовал одновременному выделению до 20 фрагментных ионов MS2. Максимальное время накопления ионов было установлено равным 50 мс для ионов-предшественников и 110 мс для ионов-фрагментов. Поиск, идентификация пиков и оценка интенсивности пиков репортерных ионов проводились с использованием вычислительной платформы MaxQuant (1.5.7.4; Институт биохимии им. Макса Планка) при настройках по умолчанию для FDR 1%.

Биоинформатический анализ

Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности процессировали для оценки качества прочтений и удаления адаптеров с использованием программ fastQC и Cutadapt 1.9.1. После этого для идентификации микроРНК проводили выравнивание на референсную базу данных микроРНК человека (miRBase 21, www.mirbase.org) с использованием программы Bowtie 1.2. Дальнейшую обработку данных для подсчета количества прочтений выполняли при помощи программы Samtools. Анализ дифференциальной экспрессии в группах сравнения с учетом ложных обнаружений проводили при помощи программного инструмента DeSeq2. Данные анализа для каждой идентифицированной микроРНК представлялись в виде таблиц со следующими

параметрами: среднее количество прочтений для каждой микроРНК в группах сравнения (Basemean), логарифм кратности изменений по основанию 2 (\log_2FC), стандартная ошибка кратности изменений с поправкой на множественные сравнения. Для дальнейшего анализа списки микроРНК фильтровали по следующим параметрам: достоверность отличий между группами с учетом множественных сравнений ($padj < 0,05$), кратность изменений ($FC \geq 2$).

Анализ потенциальных генов-мишеней дифференциально экспрессированных микроРНК выполняли с использованием базы miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>), включающей информацию о валидированных взаимодействиях мРНК-микроРНК. Выбор генов-мишеней проводили с учетом данных о валидации взаимодействий одновременно несколькими методами. Таким образом, отбирались только те мишени, для которых взаимодействия были экспериментально доказаны. Полученные списки генов-мишеней обогащали по базам данных биологических процессов и путей внутриклеточной сигнализации KEGG (<http://www.genome.jp>) и Wiki Pathways (<http://www.wikipathways.org>) с использованием программного пакета Cytoscape 3.8.0.

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1 Клиническая характеристика больных наружным генитальным эндометриозом

При изучении и анализе клинико-anamnestических характеристик пациенток с наружным генитальным эндометриозом выявлены различия в обеих группах.

Средний возраст женщин с эндометриоидными кистами яичников составил 30.27 ± 3.78 , с ретроцервикальным эндометриозом 32.89 ± 3.73 , тем самым можно заметить, что эндометриоидные кисты яичников образуются у пациенток в более молодом возрасте. Возможно, это связано с тем, что инфильтративный эндометриоз характеризуется грубыми нарушениями анатомических структур, на развитие которых требуется большее время, чем на образование эндометриоидных кист (Таблица 1).

Таблица 1. Распределение пациенток по возрасту.

Показатель	Все пациенты (n=100)		p- χ^2 тест
	I группа	II группа	
Средний возраст, лет	$30,27 \pm 3,78$	$32,89 \pm 3,73$	$>0,05$
24 – 29 лет	24 (43,6%)	9 (20,0%)	$>0,05$
30 – 35 лет	26 (47,3%)	19 (42,2%)	$>0,05$
36 – 41 год	5 (9,0%)	17 (37,8%)	$>0,05$

Хроническая тазовая боль – основная жалоба у женщин с НГЭ. Именно боль, ассоциированная с эндометриозом, оказывает огромное влияние на качество жизни пациенток. Детальный анализ жалоб показал, что интенсивность болевого синдрома во многом зависела от локализации и распространенности заболевания (Таблица 2).

Так, основными жалобами пациенток с эндометриоидными кистами яичников были боли внизу живота регулярного характера у 41 (74,5%) женщины, дисменорея у 30 (54,5%), полименорея у 17 (30,9%) и бесплодие у 31 (56%). Пациентки с ретроцервикальным эндометриозом жаловались на болевой синдром – 41 (91,1%), диспареунию – 38 (84,4%), дисменорею – 27 (60,0%), бесплодие – 21 (47%) и полименорею – 18 (40,0%). Скудные кровянистые выделения из половых путей по типу мазни до менструаций беспокоили 6 (10,9%) и 3 (6,7%) женщин соответственно в каждой группе, а после менструации – 8 (25,5%) и 4 (8,9%).

При анализе интенсивности болевого синдрома при наружном генитальном эндометриозе установлено, что пациентки II группы чаще отмечали наличие интенсивной боли – 24 (53,3%) женщины, чем пациентки I группы – 11 больных (20,0%) ($p < 0,001$).

Таким образом, наблюдаются некоторые отличия среди жалоб у пациенток с эндометриоидными кистами яичников и ретроцервикальным эндометриозом. Пациентки с ретроцервикальным эндометриозом чаще жаловались на диспареунию в отличие от женщин с эндометриоидными кистами яичников ($p < 0,05$).

Таблица 2. Жалобы пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Жалобы	I группа	II группа	p- χ^2 -тест
Боли внизу живота	41 (74,5%)	41 (91,1%)	>0,05
Дисменорея	30 (54,5%)	27 (60%)	>0,05
Диспареуния	15 (9,1%)	30 (84,4%)	<0,05
Полименорея	17 (30,9%)	18 (40,0%)	>0,05
Бесплодие	31 (56%)	21 (47%)	>0,05
Кровянистые выделения из половых путей по типу мазни до менструации	6 (10,9%)	3 (6,7%)	>0,05
Кровянистые выделения из половых путей по типу мазни после менструации	8 (25,5%)	4 (8,9%)	>0,05
Отсутствие жалоб	3 (5,5%)	2 (4,4%)	>0,05

Степень болевого синдрома оценивали с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ). При детальном опросе для уточнения особенностей болевой симптоматики при наружном генитальном эндометриозе выявлено, что все пациентки испытывали различную степень интенсивности болей (Таблица 3).

Таблица 3. Особенности болевого синдрома, ассоциированного с наружным генитальным эндометриозом.

Методы исследования /шкалы	I группа			II группа			χ^2/p
	n	%	Средние значения/ баллы	n	%	Средние значения/ баллы	
Визуальная аналоговая шкала (ВАШ)							
Боли нет	14	25,5	2,27±0,47	4	8,9	2,50±0,58	<0,05
Умеренная боль	30	54,5	4,70±0,46	17	37,8	5,06±0,43	>0,05
Сильная боль	11	20	7,09±0,30	24	53,3	7,96±0,75	<0,001
Средние оценки / баллы			4,69±0,41			5,17±0,59	>0,05

Умеренные болевые ощущения выявлены у 30 (54,5%) женщин I группы и 17 (37,8%) II группы, а сильные боли отмечены у 11 (20%) и 24 (53,3%) больных, соответственно, $p < 0,001$. Средние показатели интенсивности болевого синдрома при РЦЭ во II группе по ВАШ – 5,17±0,59, что выше, чем в I группе – 4,69±0,41 ($p > 0,05$).

Данные о менструальной функции и качестве сексуальной жизни представлены в Таблице 4. Не было выявлено статистически значимых различий в возрасте менархе, длительности менструации, продолжительности менструального цикла, а также возрасте начала половой жизни между группами пациенток.

Беременности в анамнезе были у 22 женщин (40,0%) I группы и у 29 женщин (64,4%) II группы (Рисунок 1). Сравнивая количество беременностей в каждой группе, было доказано, что в группе пациенток с ретроцервикальным эндометриозом количество беременностей больше, чем в I группе ($p=0,015$).

Таблица 4. Особенности менструальной и сексуальной функции у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Показатели	I группа	II группа	χ^2/p
Возраст менархе, лет	13,6±1,5	12,9±1,0	>0,05
Длительность менструации, дней	28,1±2,1	28,3±1,9	>0,05
Длина цикла, дней	5,3±1,6	5,4±1,3	>0,05
Возраст начала половой жизни, лет	19,4±3,4	19,0±3,4	>0,05

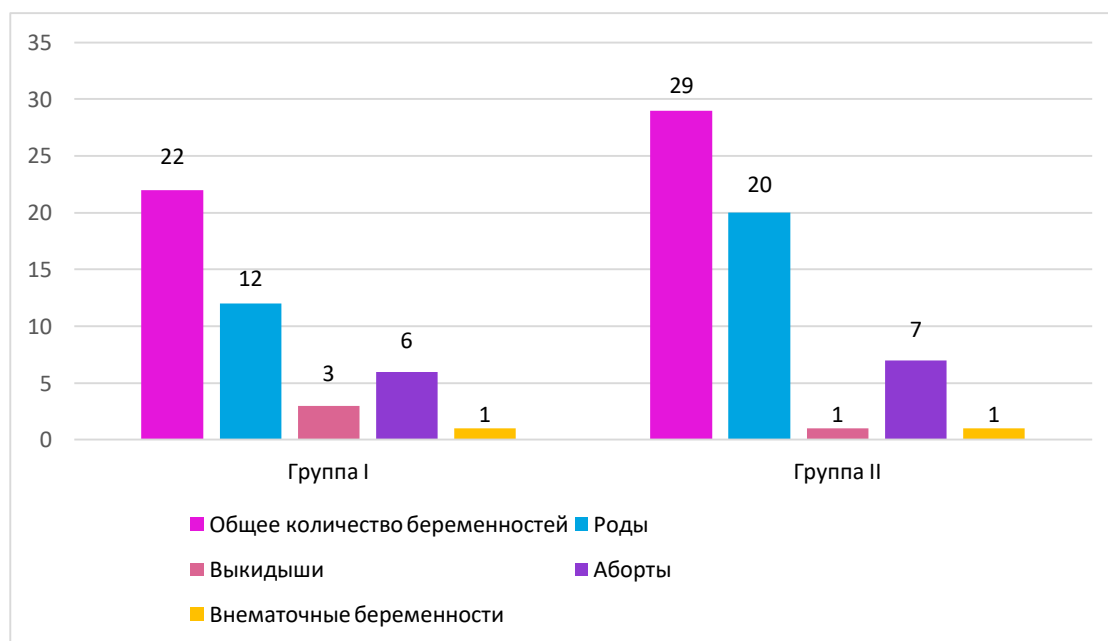


Рисунок 1. Количество беременностей в анамнезе у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Данные беременности закончились родами у 12 женщин (21,8%) I группы и у 20 женщин (44,4%) II группы ($p=0,016$). Самопроизвольные выкидыши были у 3

(5,5%) и 1(2,2%), аборт у 6 (10,9%) и 7 (15,6%) женщин I и II группы, $p>0,05$ (Таблица 5).

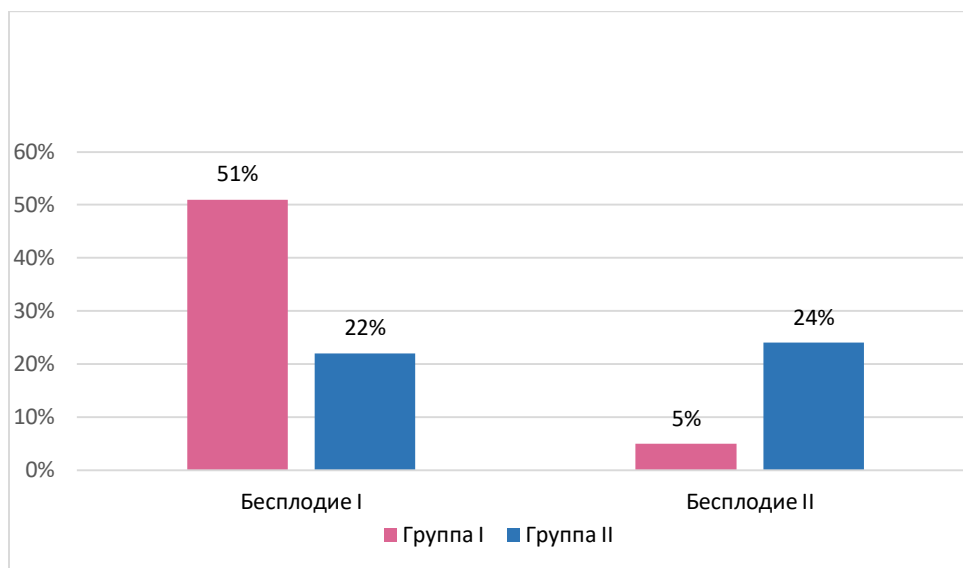


Рисунок 2. Частота первичного и вторичного бесплодия в группах.

Таблица 5. Паритет женщин с наружным генитальным эндометриозом до оперативного лечения.

Показатель	Все пациенты (n=100)		χ^2/p
	I группа	II группа	
Количество беременностей	22 (40,0%)	29 (64,4%)	<0,05
Роды	12 (21,8%)	20 (44,4%)	<0,05
Аборты	6 (10,9%)	7 (15,6%)	$>0,05$
Выкидыши	3 (5,5%)	1 (2,2%)	$>0,05$
Внематочная беременность	1 (1,8%)	1 (2,2%)	$>0,05$
Первичное бесплодие	28 (51%)	10 (22%)	<0,05
Вторичное бесплодие	3 (5%)	11 (24%)	<0,05
Безуспешные попытки ЭКО	1 (1,8%)	1 (2,2%)	$>0,05$

Первичное бесплодие встречалось чаще у пациенток с эндометриоидными кистами яичников – 28 (51%), чем у женщин с ретроцервикальным эндометриозом

– 10 (22%), $p=0,004$. В то время как вторичное бесплодие выявлялось чаще у пациенток с ретроцервикальным эндометриозом – 11 (24%) в сравнении с эндометриоидными кистами яичников – 3 (5%), $p=0,007$ (Рисунок 2).

В ходе анализа сопутствующей гинекологической патологии отмечено наличие преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе у 33 (60%) пациенток с эндометриоидными кистами яичников и 26 (58%) с ретроцервикальным эндометриозом, $p>0,05$ (Рисунок 3).

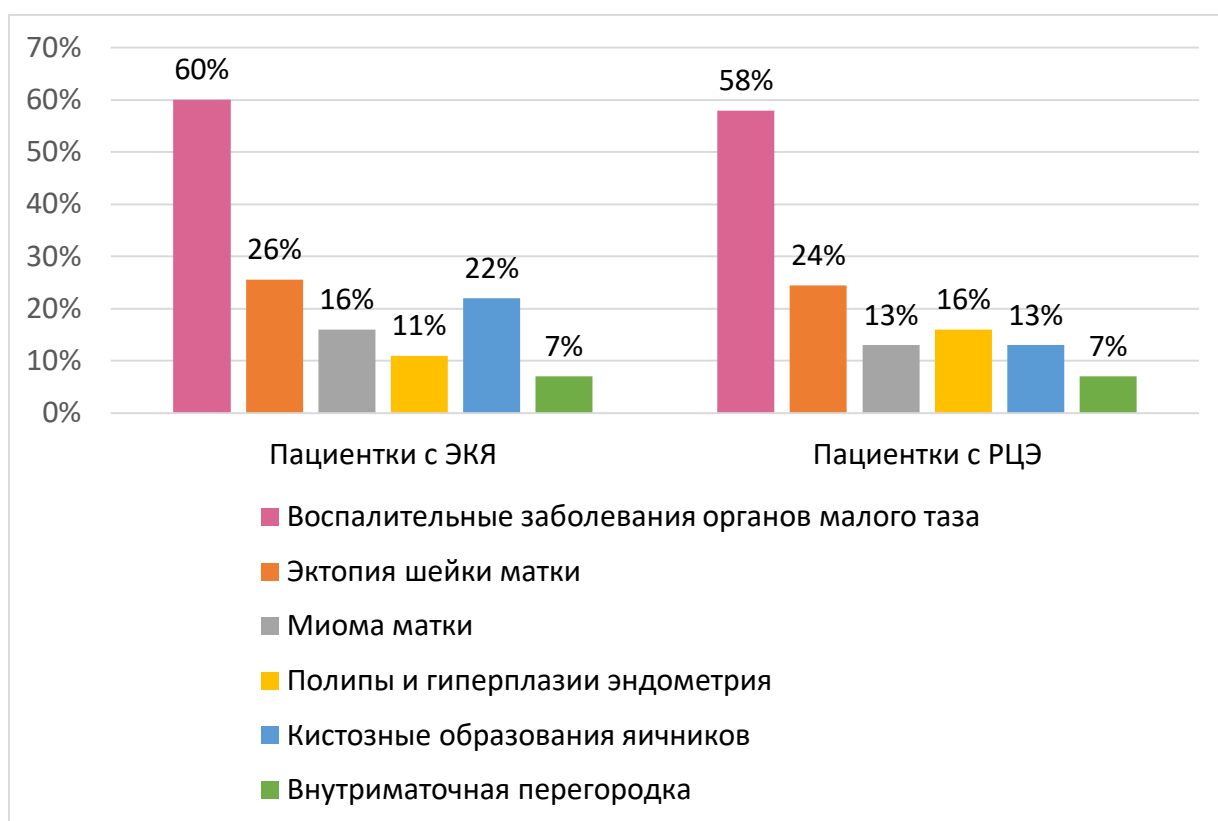


Рисунок 3. Гинекологические заболевания в анамнезе.

Одним из факторов, влияющих на возникновение и развитие эндометриоза, является наследственность [174]. В обеих обследованных группах НГЭ в наследственном анамнезе встречался чаще, чем другие заболевания, причем у родственников пациенток с РЦЭ НГЭ отмечен в достоверно большем числе наблюдений – у 20 (44%), чем у женщин при эндометриоидных кистах яичников – 14 (25%), $p<0,05$ (Таблица 6).

Таблица 6. Наследственный анамнез пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Показатель	Все пациенты (n=100)		χ^2/p
	I группа	II группа	
НГЭ	14 (25%)	20 (44%)	<0,05
Миома матки	4 (7%)	2 (4%)	>0,05
Рак молочной железы	3 (6%)	6 (13%)	>0,05
Рак яичника	4 (7%)	1 (2%)	>0,05
Рак шейки матки	3 (6%)	2 (4%)	>0,05
Рак прямой кишки	2 (4%)	1 (2%)	>0,05
Рак желудка	1 (2%)	5 (11%)	>0,05
ИБС	11 (20%)	10 (22%)	>0,05
ОНМК	8 (15%)	6 (13%)	>0,05
Сахарный диабет	12 (22%)	14 (31%)	>0,05

Структура сопутствующей экстрагенитальной патологии обследованных пациенток представлена в Таблице 7. По полученным данным статистически значимых различий у пациенток исследуемых групп не выявлено ($p>0,05$).

Частота встречаемости детских инфекционных заболеваний в анамнезе достаточно высокая, они отмечены у 40 пациенток (72,7%) в I группе и у 28 (62,2%) во II группе, что не превышает общепопуляционные значения.

Заболевания дыхательной системы были выявлены у 14 пациенток (25%) I группы, 12 (27%) пациенток II группы. Из заболеваний верхних дыхательных путей чаще встречались хронический ринит, хронический фарингит, хронический тонзиллит и хронический трахеит. Среди заболеваний легких – бронхиальная астма, хронический бронхит и пневмония.

Заболевания сердечно-сосудистой системы выявлены у 7 (12,7%) пациенток I группы и 6 (13,3%) пациенток II группы. В структуре заболеваний сердечно-сосудистой системы в исследуемых группах наиболее часто встречались пролапс митрального клапана, вегетососудистая дистония по гипотоническому типу, гипертоническая болезнь и варикозное расширение вен нижних конечностей. По

данным электрокардиографии и рентгенологического исследования органов грудной клетки у большинства пациенток патологии не было выявлено.

Заболевания пищеварительной системы диагностированы у 13 (23,6%) пациенток I группы и 14 (31,1%) пациенток II группы. Наиболее часто выявляли хронический гастрит, хронический гастродуоденит, дискинезию желчевыводящих путей, хронический холецистит, желчнокаменную болезнь и хронический панкреатит.

Наличие патологии мочевыделительной системы в анамнезе выявлено у 3 (5,5%) пациенток I группы и 5 (11,1%) пациенток II группы. Из них наиболее часто встречались хронический цистит, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь.

Заболевания эндокринной системы выявлены у 8 (14,5%) пациенток I группы и 4 (8,9%) пациенток II группы. В структуре заболеваний эндокринной системы в обследуемых группах наиболее часто выявляли сахарный диабет II типа и патологию щитовидной железы, в том числе и аутоиммунного генеза.

Таблица 7. Экстрагенитальная патология у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Показатель	Все пациенты (n=100)		χ^2/p
	I группа	II группа	
Заболевания ССС	7 (12,7%)	6 (13,3%)	>0,05
Заболевания ЖКТ	13 (23,6%)	14 (31,1%)	>0,05
Заболевания печени и желчевыводящих путей	6 (10,9%)	4 (8,9%)	>0,05
Заболевания органов дыхания	14 (25%)	12 (27%)	>0,05
Заболевания мочевыделительной системы	3 (5,5%)	5 (11,1%)	>0,05
Эндокринная патология	8 (14,5%)	4 (8,9%)	>0,05
Заболевания органов зрения	14 (24,5%)	3 (6,7%)	>0,05
Инфекционные заболевания в детском возрасте	40 (72,7%)	28 (62,2%)	>0,05

В анамнезе у исследуемых пациенток были выявлены генитальные и экстрагенитальные операции. По данным анамнеза, у 13 женщин I группы и у 16 II группы имелись оперативные вмешательства по поводу экстрагенитальных заболеваний, таких как аппендицит, холецистит, паховые и пупочные грыжи, опухоли молочных желез, что не являлось статически значимым и не оказывало достоверного влияния на риск развития НГЭ, однако было выявлено, что пациенткам с эндометриозами яичников чаще проводилась резекция молочных желез по сравнению с женщинами II группы, $p=0,023$ (Таблица 8).

При анализе гинекологических операций было выявлено, что у пациенток I группы чаще, чем у пациенток II группы в анамнезе имелась резекция яичников – у 14 (25%) и 4 (9%) в каждой группе, соответственно, $p=0,032$. Исходя из этого, можно предположить, что женщины, у которых были в анамнезе резекции яичников, имеют повышенный риск развития рецидива кистозных образований. Наличие других видов оперативных вмешательств на органах малого таза (миомэктомия, операции по поводу апоплексии яичников, аднексэктомия) не оказывают существенного влияния на рецидив заболевания (Рисунок 4).

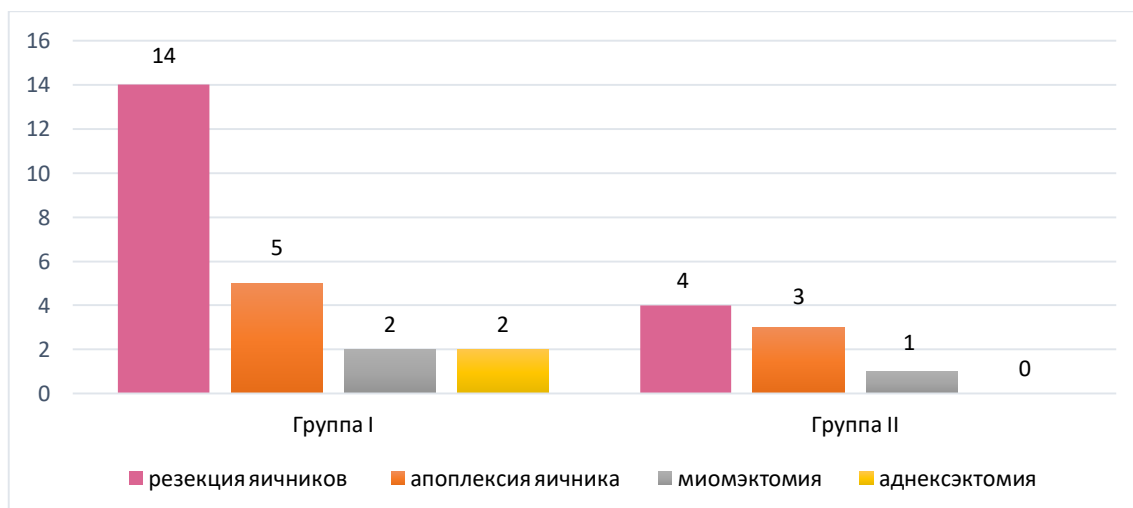


Рисунок 4. Гинекологические операции в анамнезе у пациенток с эндометриозом.

Все пациентки из групп исследования были оперированы по поводу наружного генитального эндометриоза. Им было выполнено лапароскопическое

оперативное лечение с иссечением всех очагов эндометриоза и их последующим гистологическим исследованием.

Произведено сравнение длительности оперативного лечения у пациенток исследуемых групп (Таблица 9). Выявлены достоверные различия у пациенток I и II группы: у пациенток с эндометриоидными кистами яичников средняя продолжительность операции составляет $60,11 \pm 3,70$ минут, а у пациенток с ретроцервикальным эндометриозом – $96,33 \pm 7,38$ мин ($p < 0,001$).

После проведения операции оценивали кровопотерю у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. В ходе исследования выявлено, что у женщин с ретроцервикальным эндометриозом кровопотеря во время оперативного лечения составляет в среднем $118 \pm 4,48$ мл, что достоверно выше, чем у пациенток с эндометриоидными кистами яичников, у которых средняя кровопотеря равна $86 \pm 7,12$ мл ($p < 0,05$) (Таблица 10).

Таблица 8. Перенесенные оперативные вмешательства у больных наружным генитальным эндометриозом.

Операции в анамнезе	I группа	II группа	χ^2/p
Экстрагенитальные			
Холецистэктомия	–	2 (4,4%)	$>0,05$
Аппендэктомия	9 (16%)	12 (26,7%)	$>0,05$
Пластика паховых и пупочных грыж	2 (3,6%)	2 (4,4%)	$>0,05$
Резекция молочной железы	6 (11%)	–	$<0,05$
Гинекологические			
Резекция яичников	14 (25%)	4 (9%)	$<0,05$
Аднексэктомия	2 (2%)	–	$>0,05$
Миомэктомия	2 (8%)	1 (2,2%)	$>0,05$
Операции по поводу апоплексии яичника	3 (0,0%)	5 (11,1%)	$>0,05$
Операции по поводу НГЭ в анамнезе	16 (29,0%)	10 (22,2%)	$>0,05$

Таблица 9. Длительность операции у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Время	Все пациенты (n=100)		χ^2/p
	I группа	II группа	
Среднее время, мин	60,11±3.70	96,33±7.38	<0,001

Таблица 10. Интраоперационная кровопотеря у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Кровопотеря	Все пациенты (n=100)		χ^2/p
	I группа	II группа	
Средняя кровопотеря, мл	86±7,12	118±4,48	<0,05

При хирургическом лечении эндометриоза не всегда удается удалить все очаги, так как микроскопические и атипичски расположенные поражения могут быть не замечены. Поэтому после оперативного лечения 60% пациенток в нашем исследовании получали гормональную терапию, с преимущественным использованием гестагенов.

При желании женщины реализовать репродуктивную функцию, планирование беременности было рекомендовано через 2-3 месяца после оперативного лечения.

Больные с бесплодием находились под наблюдением в течение 3 лет после проведенного хирургического лечения для оценки сроков и методов реализации репродуктивной функции. Беременность наступила у 52% женщин с бесплодием, обратившихся за оперативным лечением. В среднем беременность наступала через 12-13 месяцев (включая контрацепцию в течение 3 месяцев). Способы реализации репродуктивной функции у пациенток с бесплодием представлены в Таблице 11.

Анализ способов реализации репродуктивной функции позволил выявить большую частоту спонтанных беременностей по сравнению с наступившими в результате применения методов ВРТ: 10 (31%) и 3 (10%) в группе ЭКЯ ($p=0,029$), 14 (66%) и 3 (14%) в группе РЦЭ ($p<0,001$). Эти данные свидетельствуют о высокой

вероятности наступления самопроизвольной беременности после оперативного лечения пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Таблица 11. Способы реализации репродуктивной функции у женщин с бесплодием в исследуемых группах.

Количество пациенток с бесплодием	Самопроизвольно наступившая беременность	Беременность в результате применения методов ВРТ	Общее количество беременностей	Наличие других факторов бесплодия
I группа, n=31 (56%)	10 (31%)	3 (10%)	13 (42%)	2 (6%)
II группа, n=21 (47%)	14 (66%)	3 (14%)	17 (81%)	1 (4%)

Частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, достоверно выше среди женщин, которые были прооперированы по поводу ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31, $p=0,06$.

За трехлетний период наблюдения за пациентками после оперативного лечения наружного генитального эндометриоза и восстановительной терапии рецидивы заболевания выявлены у 21 (21%) пациентки из обеих групп: 11 (20%) женщин I группы и 10 (22,2%) II группы. При этом каждый третий случай рецидива констатирован уже через год после операции (Таблица 12).

Таблица 12. Диагностика возникновения рецидива эндометриоза в зависимости от времени, прошедшего после операции.

Время возникновения рецидива	Пациентки с рецидивом ЭКЯ	Пациентки с рецидивом РЦЭ	Процент рецидива ЭКЯ	Процент рецидива РЦЭ	Общий процент рецидива НГЭ (n=100)
1 год	3	9	5,5%	20%	12%
2 года	3	—	5,5%	—	3%
3 года	5	1	9%	2,2%	6%

3.2 Результаты молекулярных исследований у больных наружным генитальным эндометриозом

3.2.1 Анализ экспрессии микроРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия

В последнее время профилирование и сравнительный анализ экспрессии микроРНК в тканях эндометрия являются предпочтительным подходом для выявления микроРНК, участвующих в патогенезе эндометриоза.

В данной работе методом секвенирования была проведена оценка экспрессии малых РНК в очагах эндометриоза ретроцервикальной локализации и в эндометриоидных кистах яичника. На сегодняшний день остается открытым вопрос о зависимости экспрессии микроРНК в тканях эктопического эндометрия от смены фаз менструального цикла. Поэтому в данной работе были использованы образцы, полученные в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.

Для исследования отбирался биоматериал пациенток, у которых эндометриоидные гетеротопии выявлялись только в одной локализации. Для сравнения использовались парные образцы эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом, а также непарные образцы эндометрия женщин, у которых данное заболевание не было обнаружено.

Были проанализированы следующие группы сравнения для пролиферативной и секреторной фазы менструального цикла: Ec/Eu – эктопический / эутопический эндометрий (парный), Ec/N – эктопический / эутопический (непарный), Eu/N – эутопический эндометрий больных и пациенток без патологии.

При ретроцервикальном эндометриозе в групповом сравнении парных и непарных образцов выявлено сходное количество дифференциально экспрессирующихся микроРНК (ДЭМ) в эктопическом эндометрии.

Представленность ДЭМ для каждого сравнения, а также количество микроРНК с повышенной и пониженной экспрессией приведены в Таблице 13.

Таблица 13. Количественные показатели экспрессии микроРНК в тканях эндометрия при ретроцервикальном эндометриозе.

Фаза	Пролиферативная		Секреторная	
	Ес/Еu	Ес/Н	Ес/Еu	Ес/Н
Общее количество	74	63	64	59
Повышенная экспрессия	34	33	29	34
Пониженная экспрессия	40	30	35	25

Пересечения списков микроРНК для каждого сравнения показало, что большинство ДЭМ являются общими для обоих сравнений как в пролиферативную, так и в секреторную фазы цикла. Также обращает на себя внимание заметное количество уникальных ДЭМ для каждого сравнения. Общие и уникальные ДЭМ для этих сравнений представлены в Таблице 13. Различия в сравнении Еu/Н были менее выражены: 4 ДЭМ в группе образцов пролиферативной фазы и 17 ДЭМ в группе секреторной фазы.

Для изучения возможного влияния менструального цикла на экспрессию микроРНК сравнивали списки ДЭМ из парных и непарных групп пролиферативной (1) и секреторной (2) фаз. В парных выборках было выявлено 50 общих ДЭМ, а также 24 и 14 ДЭМ, уникальных для каждого сравнения (Ес/Еu-1 vs Ес/Еu-2). Аналогичные результаты были получены для непарных групп (Ес/Н-1 vs Ес/Н-2), хотя количество общих ДЭМ для каждого сравнения было меньше, чем в парных выборках. Распределение между сравниваемыми группами и список ДЭМ представлены в Таблице 14. Важно отметить, что в обоих сравнениях не было обнаружено ДЭМ с противоположно направленными изменениями экспрессии.

Таблица 14. Экспрессия микроРНК в очагах ретроцервикального эндометриоза в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла. Приведены списки общих и отличающихся ДЭМ при парных и непарных сравнениях.

Сравнение	Ес/Еу			Ес/Norm					
	Общие	Пролиферат-я	Секрет-я	Общие	Пролиферат-я	Секрет-я			
↑ (Кол-во)	22	12	7	20	13	13			
↓ (Кол-во)	28	12	7	15	15	10			
мкРНК ↑	<i>let-7e-5p</i>	<i>miR-328-3p</i>	<i>miR-127-3p</i>	<i>miR-490-5p</i>	<i>miR-1-3p</i>	<i>miR-30c-5p</i>	<i>let-7d-3p</i>	<i>let-7e-5p</i>	
	<i>miR-1-3p</i>	<i>miR-378a-3p</i>	<i>miR-133a-3p</i>	<i>miR-10a-3p</i>	<i>miR-100-5p</i>	<i>miR-328-3p</i>	<i>miR-1296-5p</i>	<i>miR-101-3p</i>	
	<i>miR-100-5p</i>	<i>miR-378a-5p</i>	<i>miR-193b-3p</i>	<i>miR-129-5p</i>	<i>miR-10a-3p</i>	<i>miR-378a-3p</i>	<i>miR-133a-3p</i>	<i>miR-125a-5p</i>	
	<i>miR-139-5p</i>	<i>miR-378c</i>	<i>miR-195-3p</i>	<i>miR-139-3p</i>	<i>miR-10a-5p</i>	<i>miR-378a-5p</i>	<i>miR-193b-3p</i>	<i>miR-129-5p</i>	
	<i>miR-143-3p</i>	<i>miR-490-3p</i>	<i>miR-214-3p</i>	<i>miR-27a-3p</i>	<i>miR-139-3p</i>	<i>miR-378c</i>	<i>miR-21-3p</i>	<i>miR-21-5p</i>	
	<i>miR-143-5p</i>	<i>miR-504-5p</i>	<i>miR-23a-3p</i>	<i>miR-7704</i>	<i>miR-139-5p</i>	<i>miR-490-3p</i>	<i>miR-23a-3p</i>	<i>miR-22-3p</i>	
	<i>miR-145-3p</i>	<i>miR-574-5p</i>	<i>miR-23b-3p</i>	<i>miR-7706</i>	<i>miR-143-3p</i>	<i>miR-95-3p</i>	<i>miR-3195</i>	<i>miR-24-3p</i>	
	<i>miR-145-5p</i>	<i>miR-95-3p</i>	<i>miR-24-3p</i>		<i>miR-143-5p</i>		<i>miR-320a</i>	<i>miR-26a-5p</i>	
	<i>miR-193a-5p</i>	<i>miR-99b-3p</i>	<i>miR-27b-3p</i>		<i>miR-145-3p</i>		<i>miR-320c</i>	<i>miR-27a-3p</i>	
	<i>miR-28-3p</i>		<i>miR-3195</i>		<i>miR-145-5p</i>		<i>miR-4508</i>	<i>miR-30e-3p</i>	
	<i>miR-28-5p</i>		<i>miR-574-3p</i>		<i>miR-193a-5p</i>		<i>miR-504-5p</i>	<i>miR-30e-5p</i>	
	<i>miR-320a</i>		<i>miR-99b-5p</i>		<i>miR-28-3p</i>		<i>miR-574-3p</i>	<i>miR-363-3p</i>	
	<i>miR-320c</i>				<i>miR-28-5p</i>		<i>miR-574-5p</i>	<i>miR-4443</i>	
	мкРНК ↓	<i>miR-106b-3p</i>	<i>miR-200b-3p</i>	<i>miR-101-3p</i>	<i>miR-141-3p</i>	<i>miR-15b-5p</i>		<i>miR-106b-3p</i>	<i>miR-1247-5p</i>
		<i>miR-107</i>	<i>miR-200b-5p</i>	<i>miR-146a-5p</i>	<i>miR-142-3p</i>	<i>miR-17-5p</i>		<i>miR-107</i>	<i>miR-181b-5p</i>
<i>miR-144-3p</i>		<i>miR-200c-3p</i>	<i>miR-148a-3p</i>	<i>miR-194-5p</i>	<i>miR-182-5p</i>		<i>miR-144-3p</i>	<i>miR-199b-5p</i>	
<i>miR-144-5p</i>		<i>miR-20a-5p</i>	<i>miR-148a-5p</i>	<i>miR-196b-5p</i>	<i>miR-183-5p</i>		<i>miR-146b-5p</i>	<i>miR-200a-5p</i>	
<i>miR-146b-5p</i>		<i>miR-34c-5p</i>	<i>miR-148b-3p</i>	<i>miR-199b-5p</i>	<i>miR-200a-3p</i>		<i>miR-148a-5p</i>	<i>miR-200b-5p</i>	
<i>miR-15b-5p</i>		<i>miR-3529-3p</i>	<i>miR-192-5p</i>	<i>miR-30b-5p</i>	<i>miR-200b-3p</i>		<i>miR-181a-2-3p</i>	<i>miR-345-5p</i>	
<i>miR-16-5p</i>		<i>miR-375</i>	<i>miR-203a-3p</i>	<i>miR-425-5p</i>	<i>miR-200c-3p</i>		<i>miR-185-5p</i>	<i>miR-500a-3p</i>	
<i>miR-17-5p</i>		<i>miR-424-3p</i>	<i>miR-25-3p</i>		<i>miR-20a-5p</i>		<i>miR-192-5p</i>	<i>miR-502-3p</i>	
<i>miR-182-5p</i>		<i>miR-451a</i>	<i>miR-26b-5p</i>		<i>miR-23b-5p</i>		<i>miR-196b-5p</i>	<i>miR-532-3p</i>	
<i>miR-183-5p</i>		<i>miR-486-5p</i>	<i>miR-429</i>		<i>miR-375</i>		<i>miR-203a-3p</i>	<i>miR-532-5p</i>	
<i>miR-185-5p</i>		<i>miR-501-3p</i>	<i>miR-449c-5p</i>		<i>miR-424-3p</i>		<i>miR-25-3p</i>		
<i>miR-186-5p</i>		<i>miR-652-3p</i>	<i>miR-629-5p</i>		<i>miR-451a</i>		<i>miR-429</i>		
<i>miR-200a-3p</i>		<i>miR-93-5p</i>	<i>miR-92a-3p</i>		<i>miR-486-5p</i>		<i>miR-450a-5p</i>		
<i>miR-200a-5p</i>					<i>miR-501-3p</i>		<i>miR-503-5p</i>		
					<i>miR-93-5p</i>		<i>miR-652-3p</i>		

Среди уникальных ДЭМ были те, которые прошли условия фильтрации (кратность изменений, скорректированное значение p , число прочтений) в одном из сравнений, но присутствовали в обоих списках, и те, которые были обнаружены только в пролиферативной фазе (выделены в Таблице 13), но отсутствовали в секреторной фазе. В паре Ес/Еу было выявлено 5 ДЭМ, обнаруженных только в пролиферативной фазе: одна со сниженной экспрессией (*miR-92a-3p*) и четыре с повышенной (*miR-195-3p*, *-24-3p*, *-574-3p*, *-99b-5p*). В паре Ес/Н было обнаружено 13 ДЭМ, однозначно представленных в пролиферативной фазе: восемь с повышенной (*let-7d-3p*, *miR-193b-3p*, *-23a-3p*, *-320a*, *-320c*, *-504-5p*, *-574-3p*, *-574-5p*) и пять с пониженной экспрессией (*miR-106b-3p*, *-107*, *-146b-5p*, *-185-5p*, *-196b-5p*).

Исследования экспрессии микроРНК были также проведены и при эндометриоидных кистах яичников. По данным секвенирования было показано,

что при сравнении экспрессии в кисте относительно эутопического эндометрия в пролиферативную фазу обнаруживается 93 ДЭМ, из которых 42 с повышенной и 51 с пониженной экспрессией. В секреторную фазу было выявлено 117 ДЭМ, включающих 47 ДЭМ с повышенной и 70 с пониженной экспрессией.

Сравнение списков ДЭМ для каждой фазы показало 35 общих микроРНК, а также 58 и 82 уникальных для пролиферативной и секреторной фаз, соответственно (Таблица 15).

Таким образом, в эндометриоидной кисте яичника наблюдается больше фазовых отличий по сравнению с ретроцервикальным эндометриозом.

Для выявления микроРНК, экспрессия которых не зависит от локализации, было произведено сравнение списков ДЭМ кисты и ретроцервикальных очагов в пролиферативную и секреторные фазы. При сравнении было выявлено 23 микроРНК экспрессирующихся в обеих локализациях в пролиферативную фазу и 12 микроРНК в секреторную фазу. Также было выявлено 12 общих микроРНК, экспрессия которых не зависит ни от локализации, ни от фазы менструального цикла: miR-143-5p, -145-3p, -17-5p, -182-5p, -183-5p, -200a-3p, -200a-5p, -200b-3p, -200c-3p, -203a-3p, -34c-5p, -449c-5p (Таблица 16).

Наличие значительного числа уникальных ДЭМ в пролиферативную и секреторную фазы свидетельствует о зависимости экспрессии микроРНК от фазы менструального цикла. Поэтому эти параметры должны учитываться при планировании экспериментов и сопоставлении различных наборов данных.

Таблица 15. Дифференциальная экспрессия микроРНК в тканях эндометрия при эндометриоидных кистах яичников в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.

Сравнение	Ес/Еу						
	Общие		Пролиферативная		Секреторная		
Группа							
↑ (Кол-во)	13		29		34		
↓ (Кол-во)	22		29		48		
мкРНК ↑	miR-127-3p		let-7c-5p	miR-376c-3p	let-7a-2-3p	miR-22-3p	miR-6502-5p
	miR-127-5p		miR-1-3p	miR-379-5p	miR-100-5p	miR-223-5p	miR-653-3p
	miR-134-5p		miR-10b-5p	miR-382-3p	miR-1243	miR-30a-5p	miR-656-3p
	miR-136-3p		miR-130a-3p	miR-409-3p	miR-1298-5p	miR-30b-5p	miR-874-5p
	miR-143-5p		miR-136-5p	miR-409-5p	miR-133a-3p	miR-455-3p	
	miR-145-3p		miR-139-5p	miR-411-5p	miR-133b	miR-4649-3p	
	miR-202-5p		miR-143-3p	miR-493-3p	miR-134-3p	miR-4791	
	miR-381-3p		miR-145-5p	miR-495-3p	miR-135a-5p	miR-508-5p	
	miR-382-5p		miR-193b-3p	miR-508-3p	miR-154-5p	miR-510-5p	
	miR-493-5p		miR-199a-5p	miR-509-3p	miR-181d-5p	miR-514b-3p	
	miR-509-3-5p		miR-221-5p	miR-514a-3p	miR-202-3p	miR-514b-5p	
	miR-708-3p		miR-28-3p	miR-574-3p	miR-214-3p	miR-539-3p	
	miR-708-5p		miR-28-5p	miR-654-3p	miR-216a-3p	miR-539-5p	
			miR-29c-3p	miR-889-3p	miR-216a-5p	miR-592	
			miR-369-3p		miR-217	miR-615-3p	
мкРНК ↓	miR-106a-5p	miR-20b-5p	let-7d-5p	miR-20a-5p	miR-127-3p	miR-381-3p	
	miR-10a-3p	miR-34c-5p	miR-106b-3p	miR-25-3p	miR-127-5p	miR-382-5p	
	miR-10a-5p	miR-363-3p	miR-106b-5p	miR-3613-5p	miR-134-5p	miR-493-5p	
	miR-141-3p	miR-375	miR-107	miR-429	miR-136-3p	miR-509-3-5p	
	miR-142-3p	miR-425-5p	miR-1307-3p	miR-451a	miR-143-5p	miR-708-3p	
	miR-142-5p	miR-449a	miR-135b-5p	miR-452-5p	miR-145-3p	miR-708-5p	
	miR-17-5p	miR-449c-5p	miR-144-3p	miR-454-3p	miR-202-5p		
	miR-182-5p		miR-144-5p	miR-484			
	miR-183-5p		miR-15a-5p	miR-486-5p			
	miR-196b-5p		miR-15b-3p	miR-501-3p			
	miR-200a-3p		miR-15b-5p	miR-652-3p			
	miR-200a-5p		miR-16-5p	miR-92a-3p			
	miR-200b-3p		miR-185-5p	miR-93-5p			
	miR-200c-3p		miR-192-5p	miR-96-5p			
	miR-203a-3p		miR-194-5p				

Таблица 16. Список микроРНК, не чувствительных к локализации и фазе менструального цикла.

Киста-РЦ 1/2

— Пролиферативная
— Секреторная

Киста-РЦ 1/2					
Пролиферативная		Общие		Секреторная	
↑ Экспр.	↓ Экспр.	↑ Экспр.	↓ Экспр.	↑ Экспр.	↓ Экспр.
miR-1-3p	miR-106b-3p	miR-143-5p	miR-17-5p	miR-100-5p	miR-141-3p
miR-127-3p	miR-144-3p	miR-145-3p	miR-182-5p	miR-10a-3p	miR-142-3p
miR-139-5p	miR-144-5p		miR-183-5p	miR-133a-3p	miR-181b-5p
miR-143-3p	miR-15b-5p		miR-200a-3p	miR-95-3p	miR-200b-5p
miR-145-5p	miR-16-5p		miR-200a-5p		miR-30b-5p
miR-193b-3p	miR-185-5p		miR-200b-3p		miR-345-5p
miR-28-3p	miR-192-5p		miR-200c-3p		miR-375
miR-28-5p	miR-20a-5p		miR-203a-3p		miR-425-5p
miR-574-3p	miR-25-3p		miR-34c-5p		
	miR-486-5p		miR-449c-5p		
	miR-501-3p				
	miR-652-3p				
	miR-93-5p				
	miR-92a-3p				

3.2.2 Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии

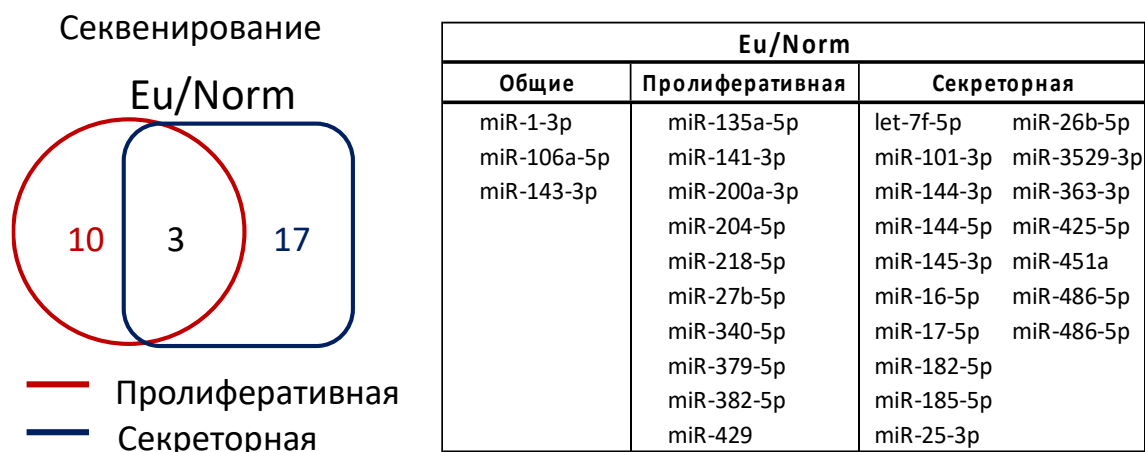
В работе был проведен анализ экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии больных эндометриозом в сравнении с пациентами без данной патологии в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла. По данным секвенирования было выявлено 13 ДЭМ в эутопическом эндометрии в пролиферативную фазу и 20 ДЭМ в секреторную фазу цикла. Пересечение списков ДЭМ для обеих фаз показало три микроРНК общих для обеих фаз: miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p (Рисунок 5А). Анализ экспрессии данных микроРНК проводили методом ПЦР с использованием образцов тканей эндометрия, полученных в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла. Для всех исследуемых микроРНК было установлено повышение экспрессии в эутопическом эндометрии больных эндометриозом (Рисунок 5Б). Таким образом, экспрессия данных микроРНК не чувствительна к фазе цикла, что в перспективе может служить положительным фактором для отбора данных микроРНК в качестве маркеров патологического эндометрия при эндометриозе.

3.2.3 Дифференциальная экспрессия микроРНК в стромальных клетках эндометрия

Необходимо отметить, что при изучении содержания микроРНК в тканях оценивается суммарная экспрессия, вклад в которую вносят все типы клеток, содержащиеся в образце. По данным гистологических исследований, в тканях эндометриоидных кист яичников наблюдается преобладание стромального компонента, тогда как эпителиальный компонент менее выражен.

Нами была отработана методика получения популяции клеток из тканей кист на 90% состоящих из стромальных клеток.

А



Б

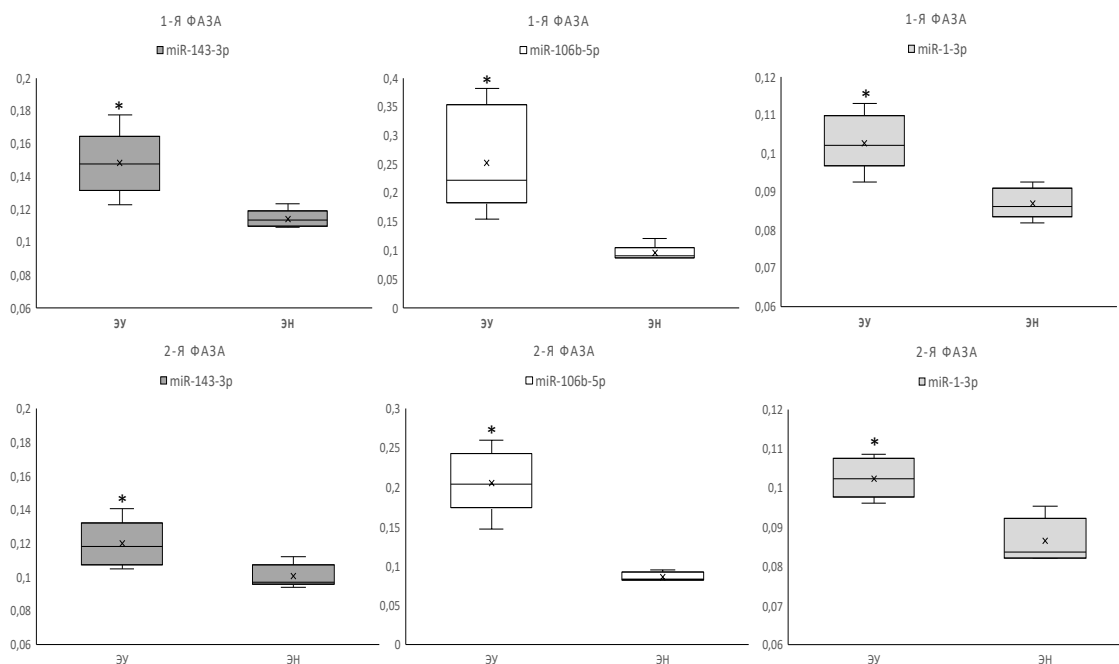


Рисунок 5. Повышение экспрессии miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p в эутопическом эндометрии больных эндометриозом в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла

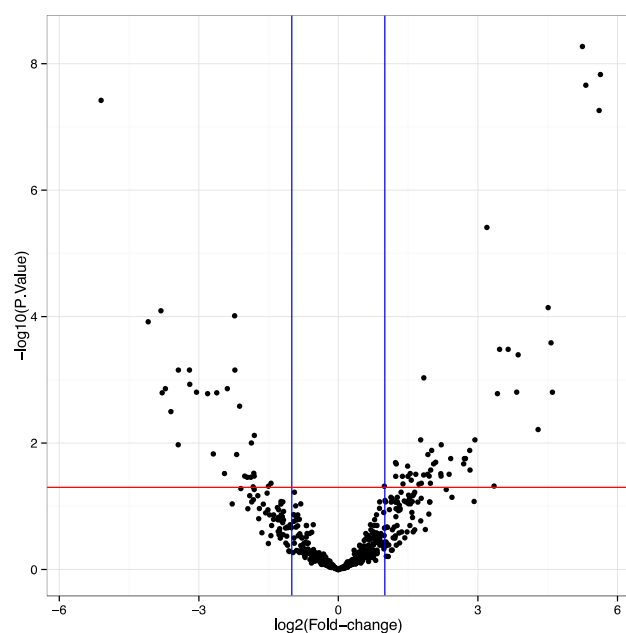
А. Дифференциальная экспрессия микроРНК в тканях эутопического эндометрия (Eu) больных ретроцервикальным эндометриозом относительно тканей нормального эндометрия (Norm) по данным секвенирования.

Б. Повышение экспрессии miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла по данным ОТ-ПЦР (Эу – эутопический, Эн – нормальный эндометрий; значения представлены в виде $1/\Delta\Delta Ct$).

Клетки выделяли из образцов тканей, полученных в пролиферативную фазу менструального цикла. Сразу после выделения из тканей клетки использовались для анализа состава микроРНК методом секвенирования с целью уточнения вклада стромального компонента в тканевую экспрессию.

Было выявлено 57 ДЭП, из которых 39 демонстрировали повышенную и 18 пониженную экспрессию в стромальных клетках эктопического эндометрия относительно клеток из эутопического эндометрия. Распределение и список наиболее представленных ДЭМ в стромальных клетках показаны на Рисунке 6.

При сравнении списков микроРНК дифференциально экспрессирующихся в стромальных клетках и тканях эктопического эндометрия было выявлено 24 совпадающих ДЭМ (Таблица 17). Оставшиеся 33 ДЭМ из списка, полученного для стромальных клеток, также присутствовали в списках ДЭМ, полученных для ткани кисты, однако экспрессия данных микроРНК в тканях достоверно не изменялась. Представленные результаты демонстрируют, что при исследовании образцов тканей суммарное определение экспрессии может маскировать представленность и направление изменений индивидуальных микроРНК. В этой связи представляется перспективной разработка эффективных методических подходов, позволяющих получать отдельные клеточные популяции, а также имеющих достаточную чувствительность для регистрации изменений исследуемых параметров.

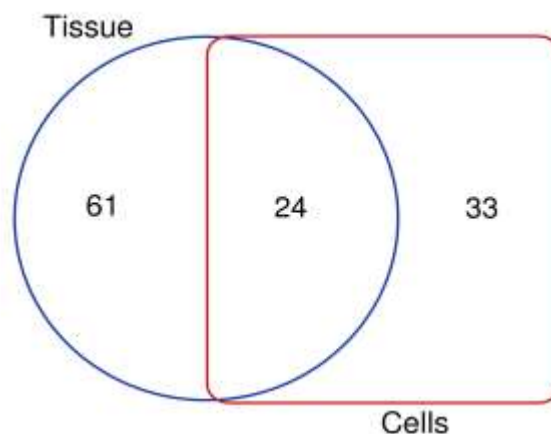


miRNA	Log2FC	P-v. adj.	miRNA	Log2FC	P-v. adj.
hsa-miR-143-3p	1,54	3,04E-02	hsa-miR-199b-5p	-1,82	3,01E-02
hsa-let-7b-5p	1,38	3,36E-02	hsa-miR-196b-5p	-2,39	1,38E-03
hsa-let-7c-5p	1,54	7,20E-02	hsa-miR-34c-5p	-3,20	7,01E-04
hsa-miR-486-5p	3,65	3,30E-04	hsa-miR-375-3p	-2,69	1,49E-02
hsa-let-7d-5p	1,26	8,53E-02	hsa-miR-424-5p	-1,73	6,81E-02

Рисунок 6. Дифференциальная экспрессия микроРНК в стромальных клетках эндометриоидных кист яичника. В таблице указаны наиболее представленные ДЭМ.

Таблица 17. Экспрессия микроРНК в тканях и стромальных клетках эндометриоидных кист яичника.

miRNA	Tissue		Cells	
	Base mean	log2(FC)	Base mean	log2(FC)
hsa-let-7c-5p	10235	1,62	17207	1,55
hsa-miR-1-3p	3145	3,91	3042	3,48
hsa-miR-127-3p	262	2,24	3614	1,14
hsa-miR-134-5p	309	2,50	439	1,28
hsa-miR-139-5p	161	1,16	333	1,78
hsa-miR-143-3p	113642	1,51	109736	1,56
hsa-miR-145-3p	1038	0,99	1161	0,89
hsa-miR-202-5p	3432	10,02	385	2,93
hsa-miR-28-3p	1968	1,47	1466	0,99
hsa-miR-28-5p	223	1,00	1156	1,25
hsa-miR-381-3p	5351	2,37	3981	1,24
hsa-miR-382-5p	167	1,72	410	1,36
hsa-miR-508-3p	756	7,65	474	5,25
hsa-miR-509-3-5p	1953	8,14	2842	5,60
hsa-miR-509-3p	116	7,27	222	5,32
hsa-miR-514a-3p	10733	9,47	5316	6,60
hsa-miR-708-3p	507	2,73	375	1,52
hsa-miR-10a-3p	223	-3,56	668	-1,63
hsa-miR-196b-5p	1074	-3,17	5439	-2,39
hsa-miR-34c-5p	4885	-2,55	1840	-3,22
hsa-miR-375	881	-5,93	1434	-2,70
hsa-miR-452-5p	118	-1,84	119	-1,86



3.2.4 Функциональный анализ генов-мишеней малых РНК

Для полученных в ходе исследования списков ДЭМ проводили функциональный анализ с использованием базы данных (MirTarBase) потенциальных генов-мишеней. микроРНК теоретически могут взаимодействовать с множеством мРНК, поэтому по результатам поиска отбирались только наиболее вероятные пары микроРНК-мРНК, взаимодействие которых было установлено с высокой степенью валидации (подтвержденные несколькими методами: qPCR, Westernblot, Reporter assay и др.). Отобранные гены-мишени были использованы для обогащения по путям внутриклеточной сигнализации с использованием базы данных WikiPathways.

Для каждой группы сравнения были выбраны пути и процессы, из которых были составлены списки наиболее представленных хотя бы в двух группах сравнения. Выбор проводили с использованием параметров статистической значимости и достоверности отбора генов-мишеней для соответствующего процесса (XD-score, q-val.) и их представленности в пути (Гены/Путь, Гены – количество генов в наборе, Путь – общее количество генов в пути).

Общие пути для групп сравнения при ретроцервикальном эндометриозе и ЭКЯ представлены в Таблице 18. Среди клеточных процессов и сигнальных каскадов особенного внимания заслуживают пути, запускаемые пролактином, тиреотропином, эстрогенами, факторами роста и морфогенными регуляторами. В результате обогащения также обнаружился ряд путей, ассоциированных с интерлейкинами (Таблица 18, иммуномодуляторные пути), эритропоэтином (EPO), регуляторным белком p53 (TP53), которые способны регулировать различные этапы процессов воспаления, развивающихся при образовании и прогрессировании эндометриоидных гетеротопий. Кроме этого, были выявлены пути внутриклеточной сигнализации, обеспечивающие регуляцию репаративных процессов геномной ДНК в случае ее повреждения. Важно отметить, что в данных путях могут принимать участие микроРНК, поскольку при обогащении были также показаны пути, ассоциированные с повреждением ДНК: miRNA involved in DDR.

Изменение активности данных путей и процессов, с участием идентифицированных микроРНК, может оказывать существенное влияние на развитие геномной нестабильности, опосредованной процессами воспаления и оксидативного стресса в тканях эктопического эндометрия.

Таблица 18. Внутриклеточные пути и процессы, включающие гены-мишени ДЭМ.

Пути/процессы	Ес/Еи киста			Ес/Еи РЦ		
	ХД	Гены/Путь	q-value	ХД	Гены/Путь	q-value
Клеточные процессы						
Angiogenesis	1,42	15/23	4,0E-04	1,05	32/64	5,0E-07
Cell Differentiation - meta	0,85	9/16	1,1E-03	1,73	12/16	1,0E-05
DNA damage response (ATM)	1,42	40/76	4,2E-05	1,94		0,0E+00
Endochondral Ossification	0,69	30/61	9,2E-05	0,9	29/61	1,0E-05
Integrated Cancer pathway	1,97	22/35	3,2E-04	1,56	25/35	<1,0E-05
Type II diabetes mellitus	1,99	7/16	2,3E-02	2,2	9/16	3,5E-03
Иммунomodulatory пути						
IL-1 signaling pathway	0,76	20/50	2,6E-04	0,83	28/50	<1,0E-05
IL-4 signaling pathway	1,29	26/48	8,0E-05	1,49	32/48	1,0E-06
IL-5 signaling pathway	1,13	22/39	5,2E-05	1,07	26/39	<1,0E-05
IL-7 signaling pathway	1,63	14/25	4,0E-05	0,74	14/25	2,3E-04
IL-9 signaling pathway	0,84	9/16	1,1E-03	0,91	10/16	6,7E-04
Сигнальные пути						
Alpha 6 Beta 4 signaling pathway	1,21	17/31	1,0E-05	1,26	18/31	1,0E-05
BMP signalling and regulation	0,64	6/12	1,9E-02	1,26	18/31	1,0E-05
EPO Receptor Signaling	1,23	15/26	1,0E-05	1,73	18/26	<1,0E-05
Estrogen signaling pathway	2,36	12/19	3,0E-05	1,42	14/19	<1,0E-05
Keap1-Nrf2 Pathway	1,00	6/13	2,7E-02	1	7/13	1,5E-02
Leptin signaling pathway	1,53	37/61	8,0E-05	1,28	39/61	<1,0E-05
miRNAs involved in DDR	3,93	12/15	1,0E-07	4	13/15	<1,0E-05
Osteopontin Signaling	1,98	7/11	1,8E-03	1,85	9/11	6,0E-05
Prolactin Signaling Pathway	1,34	41/75	3,0E-06	1,49	49/75	<1,0E-05
TGF Beta Signaling Pathway	1,49	29/52	1,7E-05	1,29	31/52	<1,0E-05
TP53 network	1,45	12/19	3,0E-05	1,82	14/19	<1,0E-05
TSH signaling pathway	0,91	11/19	<1,0E-05	1,82	14/19	<1,0E-05
TWEAK Signaling Pathway	1,01	20/39	2,3E-03	1,02	24/39	<1,0E-05

Ес/Еи – эктопический/эутопический

Проведенное обогащение по генам-мишеням ДЭМ в стромальных клетках при эндометриозе яичников выявило процессы и пути внутриклеточной сигнализации, сходные с описанными выше для тканей кисты (выделены в Таблице 19). В стромальных клетках по данным обогащения были показаны сигнальные пути, запускаемые рядом гормонов и медиаторов. В частности, выявлялись пути, регулируемые лептином, пролактином, тиреотропином, серотонином, фолликулостимулирующим гормоном и эстрогенами.

Среди клеточных процессов заслуживают внимания процессы, ассоциированные с клеточной дифференцировкой, канцерогенезом и ангиогенезом. Так же как и в тканях, в стромальных клетках выявлялись пути

регуляции репаративных процессов при повреждении ДНК, протекающие при участии микроРНК, что также может свидетельствовать о наличии локального воспаления и сопутствующих ему процессов в эктопическом эндометрии и окружающих его тканях.

Таблица 19. Внутриклеточные пути и процессы, включающие гены-мишени ДЭМ, выявленных в стромальных клетках из эндометриоидных кист яичника.

Аннотированные пути и процессы	XD-score	Fq-value	Сет (n)	Путь (n)	Общие
<i>Процессы</i>					
miRNAs involved in DDR	2,72	2,03E-05	692	15	9
Integrated Cancer pathway	2,58	1,78E-08	692	34	18
Angiogenesis	2,32	3,02E-05	692	23	11
SRF and miRs in Smooth Muscle Differ./Prolif.	2,32	9,01E-03	692	11	5
Alpha 6 Beta 4 signaling pathway	1,52	1,41E-04	692	31	12
MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	1,16	2,96E-08	692	88	30
Cell cycle	1,13	2,36E-08	692	97	32
<i>Сигнальные пути</i>					
EPO Receptor Signaling	2,18	2,02E-05	692	26	12
Estrogen signaling pathway	2,08	8,47E-07	692	20	12
Kit receptor signaling pathway	1,93	1,53E-08	692	53	23
Osteopontin Signaling	1,82	9,01E-03	692	11	5
TGF Beta Signaling Pathway	1,82	1,53E-08	692	57	24
TSH signaling pathway	1,42	3,62E-08	692	65	25
Prolactin Signaling Pathway	1,39	3,43E-09	692	75	29
Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor	1,32	2,58E-04	692	33	12
Serotonin HTR1 Group and FOS Pathway	1,32	8,96E-04	692	32	11
Leptin signaling pathway	1,28	4,12E-08	692	61	24
<i>Иммунные пути</i>					
IL-2 Signaling pathway	1,39	1,96E-06	692	41	17
IL-5 signaling pathway	1,82	1,64E-07	692	39	18
IL-7 signaling pathway	2,08	7,52E-06	692	24	12
IL-9 signaling pathway	1,82	7,88E-03	692	15	6

3.2.5 Валидация данных секвенирования методом ПЦР

Данные секвенирования валидировали при помощи метода ПЦР в реальном времени. Для валидации отбирались представители микроРНК с пониженной или повышенной экспрессией в группах сравнения, а также несколько представителей, у которых изменение экспрессии не наблюдалось. Выбор микроРНК осуществляли на основании параметров секвенирования: количество прочтений и кратность изменений. ПЦР анализ экспрессии отобранных микроРНК в образцах тканей эктопического эндометрия относительно эутопического (Ec/Eu) или нормального

(Ec/Norm) эндометрия показал сопоставимые параметры изменений экспрессии с данными, полученными в результате секвенирования (Таблица 20).

Таблица 20. Сравнение параметров экспрессии микроРНК, полученных методами секвенирования и ПЦР.

Proliferative	PCR				NGS					
	Ec/Norm		Ec/Eu		Ec/Norm			Ec/Eu		
miRNA	LogFC	p-val	LogFC	p-val	Basemean	LogFC	p-adj	Basemean	LogFC	p-adj
miR-143-3p	4,6	1,8E-06	3,2	2,0E-03	225096	4,6	8,9E-116	191271	3,5	1,1E-21
miR-27b-3p	0,4	2,3E-01	0,9	1,8E-02	20225	0,5	6,4E-02	14383	1,1	9,6E-06
miR-181a-5p	-0,9	2,3E-02	-0,6	2,0E-01	7231	-0,3	2,9E-01	5729	-0,2	5,4E-01
miR-191-5p	-1,2	3,4E-02	-0,5	5,6E-02	4604	-0,8	6,5E-03	3818	-0,8	2,8E-02
miR-25-3p	-1,9	8,7E-03	-1,7	2,6E-02	3386	-1,9	4,9E-06	2853	-2,0	3,5E-05
miR-28-3p	2,7	2,7E-05	2,8	3,5E-04	2125	3,0	2,0E-29	1699	3,2	6,2E-30
miR-192-5p	-2,1	4,80E-02	-2,2	4,40E-02	133	-1,7	1,6E-02	259	-3,2	2,7E-07
miR-425-5p	-1,7	3,20E-02	-2,4	2,50E-03	78	-2,4	3,9E-05	92	-3,0	1,3E-07

Secretory	PCR				NGS					
	Ec/Norm		Ec/Eu		Ec/Norm			Ec/Eu		
miRNA	LogFC	p-val	LogFC	p-val	Basemean	LogFC	p-adj	Basemean	LogFC	p-adj
miR-143-3p	5,9	1,2E-06	4,4	1,6E-05	146512	5,2	3,3E-121	151907	4,0	1,2E-22
miR-27b-3p	1,2	5,2E-02	0,4	1,4E-01	22239	0,6	1,2E-01	22240	0,6	1,0E-01
miR-181a-5p	-0,6	6,0E-02	-0,8	1,2E-01	9330	-0,9	1,1E-01	7826	-0,4	1,3E-01
miR-191-5p	-0,2	6,6E-01	-0,8	2,2E-01	3749	-0,1	7,0E-01	5032	-0,8	7,6E-01
miR-25-3p	0,1	8,9E-01	-1,5	5,9E-02	2834	-0,4	2,8E-01	3963	-1,2	1,6E-01
miR-28-3p	3,6	1,1E-04	3,0	1,7E-04	3883	3,0	1,7E-33	3964	2,8	1,3E-21
miR-192-5p	1,7	2,0E-01	0,2	8,5E-01	122	-1,1	3,3E-01	56	0,9	9,9E-01
miR-425-5p	0,1	8,5E-01	-1,5	1,2E-01	53	-0,7	1,3E-02	158	-2,6	2,6E-04

3.2.6 Протеомный анализ белков стромальных клеток эктопического и эутопического эндометрия

С использованием методов масс-спектрометрической идентификации проведен протеомный анализ состава белков стромальных клеток выделенных из эктопического и эутопического эндометрия. Выявлено 245 белков с достоверно отличающейся экспрессией в стромальных клетках из эктопического эндометрия (Рисунок 7). Среди данных белков 18 оказались потенциальными мишенями ДЭМ, обнаруженными ранее в стромальных клетках (Таблица 21). Обогащение путей и процессов с использованием дифференциально экспрессированных белков

выявило пути, ассоциированные с окислительным стрессом, воспалением, митохондриальной функцией и регуляцией метаболизма (Таблица 21). Наиболее значимыми были пути с идентификаторами Proteasome Degradation и Keap1-Nrf2 Pathway, которые оказывают цитопротективное действие в условиях различных токсических воздействий, в частности в условиях окислительного стресса.

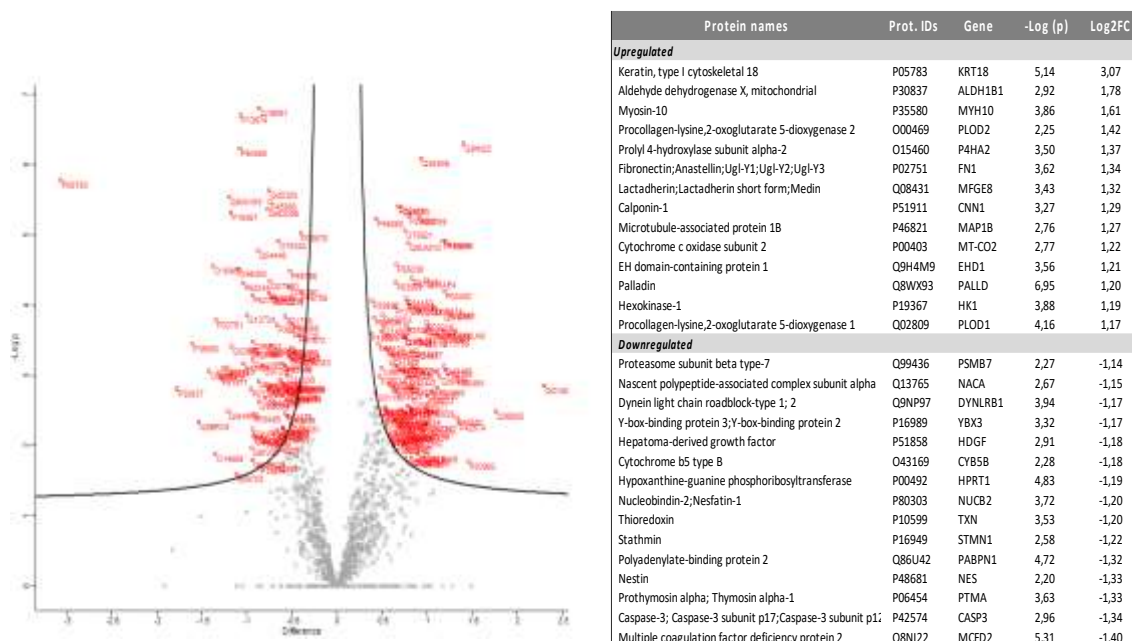


Рисунок 7. Протеомный анализ экспрессии белков в стромальных клетках эктопического и эутопического эндометрия.

Обогащение по данным путям подтверждает гипотезу о том, что в очагах эндометриоидных гетеротопий формируется провоспалительное окружение, характеризующееся развитием окислительного стресса, приводящего к повреждению белков и ДНК. Эти данные согласуются с результатами проведенных нами транскриптомных исследований, где было показано участие дифференциально экспрессированных микроРНК и их генов-мишеней в процессах репарации ДНК, что свидетельствует о генотоксическом действии патогенетических факторов при эндометриозе.

Таблица 21. Потенциальные мишени ДЭМ, выявленные по данным протеомного анализа.

miRNAs	Direction miRNAs	Direction proteins	Gene	Protein names	Functions
hsa-let-7c-5p hsa-miR-155-5p	++	-	CASP3	Caspase-3; Caspase-3 subunits p17, p12	caspase 3
hsa-miR-185-5p	+	-	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	cell morphology, migration, endocytosis and cell cycle progression
hsa-miR-22-3p	+	-	HMGB1	High mobility group protein B1	DNA-binding protein, plays a role in several cellular processes, including inflammation, cell differentiation and tumor cell migration
hsa-miR-145-3p, -22-3p, -542-3p	++-	-	MTDH	Protein LYRIC	potential oncogene
hsa-miR-432-5p	+	-	NES	Nestin	intermediate filament protein
hsa-miR-146a-5p	+	-	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	RNA-binding protein implicated in growth inhibition and the induction of differentiation of human cancer cells
hsa-miR-1-3p	+	-	PTMA	Prothymosin alpha	Transcription factor, may be associated with cell proliferation, apoptosis and the regulation of cell cycle progression in tumor cells
hsa-miR-196b-5p	-	-	RDX	Radixin	cytoskeletal protein that may be important in linking actin to the plasma membrane
hsa-miR-155-5p	+	-	SDCBP	Syntenin-1	This protein may also affect cytoskeletal-membrane organization, cell adhesion, protein trafficking, and the activation of transcription
hsa-miR-155-5p	+	-	UBQLN1	Ubiquilin-1	ubiquitin-like protein, thought to functionally link the ubiquitination machinery to the proteasome to affect in vivo protein degradation.
hsa-miR-1-3p, -155-5p, -22-5p	+++	-	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	belongs to the 14-3-3 family of proteins which mediate signal transduction by binding to phosphoserine-containing proteins
hsa-miR-155-5p	+	+	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	implicated in the control of actin polymerization in cells
hsa-miR-1-3p	+	+	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	regulator of Cullin-RING ubiquitin ligases
hsa-miR-452-5p	-	+	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	facilitate neuron guidance, growth and polarity
hsa-miR-1-3p	+	+	FN1	Fibronectin	Fibronectin is involved in cell adhesion and migration processes
hsa-miR-155-5p	+	+	LRRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59	intracellular trafficking
hsa-miR-155-5p	+	+	PDLIM5	PDZ and LIM domain protein 5	functions as a scaffold protein that tethers protein kinases to the Z-disk in striated muscles
hsa-miR-22-3p	+	+	TFRC	Transferrin receptor protein 1	cell surface receptor necessary for cellular iron uptake

Функциональный анализ 18 белков, являющихся потенциальными мишенями 12 ДЭМ показал кластеризацию на две взаимосвязанные группы (Рисунок 8). Первая группа включает 5 белков, кодируемых генами PTMA, HMGB1, NES, TFRC и CASP3, которые принимают участие в процессах выживания, репарации ДНК, пролиферации и воспаления. Вторая группа состоит из 6 генов FN1, CDC42, ARPC3, DPYSL2, RDX, YWHAZ, задействованных при адгезии, миграции, внутриклеточном транспорте и митозе. Расшифровка названий генов и их функции представлены в Таблице 21.

Вне кластеризации осталась группа из семи белков, которые по своему функциональному потенциалу способны участвовать в регуляции роста и развития, активности факторов транскрипции и ферментов, ответственных за деградацию белков.

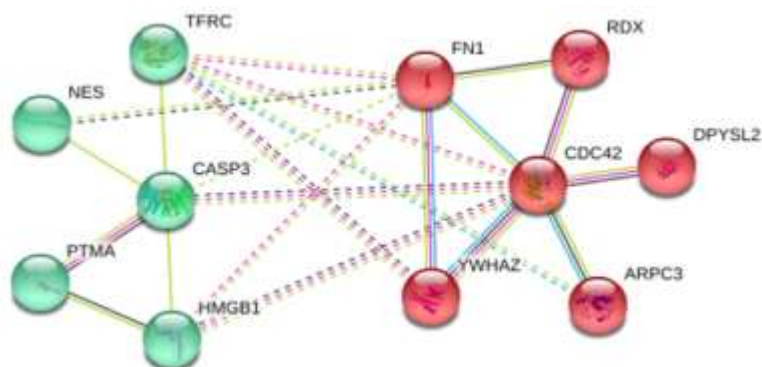


Рисунок 8. Функциональные взаимодействия выявленных протеомным анализом белков, являющихся потенциальными мишенями дифференциально экспрессирующихся микроРНК в стромальных клетках эндометрия.

Таблица 22. Изменение экспрессии белков в стромальных клетках эктопического эндометрия, полученных от больных с эндометриоидными кистами яичников с последующим рецидивом и без данного осложнения.

Ген	Белок	Рецидив +		Рецидив –		Отношение
		кратность	p	кратность	p	
CNN1	P51911	2,8	0,021	1,8	0,043	1,555
ANXA4	P46781	1,9	0,039	0,7	>0,05	2,714
STMN1	P16949	-3,5	0,008	-1,2	>0,05	2,916
HSPA2	P54652	-2,3	0,014	-0,8	>0,05	2,875

В данном исследовании были использованы образцы клеток, полученные, в частности, от женщин, у которых впоследствии обнаружился рецидив эндометриоидной кисты яичника. Сравнительный анализ образцов пациенток с рецидивом и без данного осложнения выявил четыре белка экспрессия которых отличалась в стромальных клетках эктопического эндометрия, полученного от больных с рецидивом. Было выявлено два белка с пониженной экспрессией статмин-1 (STMN1) и белок теплового шока-A2 (HSPA2), и два белка с повышенной экспрессией кальпонин-1 (CNN1) и аннексин-A4 (ANXA4). Данные по относительной экспрессии указанных белков представлены в Таблице 22.

Выявление изменения экспрессии этих белков в тканях эктопического эндометрия может рассматриваться как потенциальный способ прогнозирования рецидива при эндометриоидных кистах яичников. Однако для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие исследования с использованием методов иммунодетекции данных белков в тканях эктопического эндометрия.

3.2.7 Дифференциальная экспрессия пивиРНК в тканях эндометрия

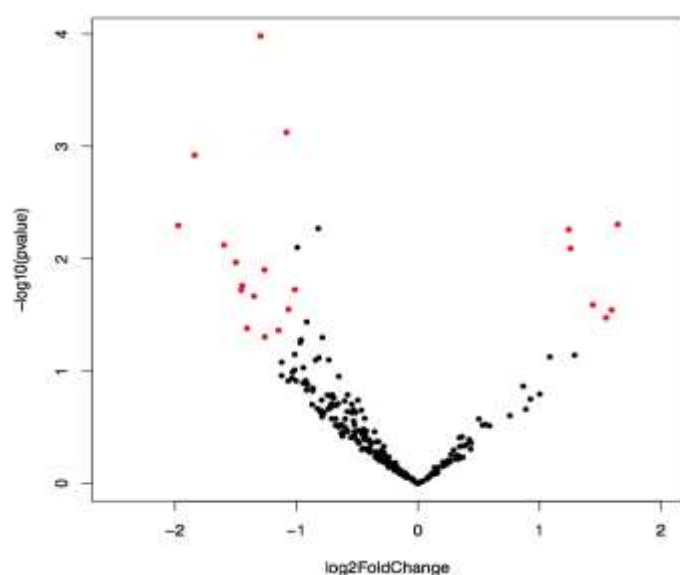
По данным, полученным в результате секвенирования малых РНК из образцов тканей эндометрия, было установлено, что в эутопическом и эктопическом эндометрии больных с эндометриоидными кистами яичников идентифицируется 197 пивиРНК. Список наиболее представленных по количеству прочтений (>4000) пивиРНК приведен в Таблице 23. Далее был проведен анализ дифференциально экспрессирующихся пивиРНК (дэ-пивиРНК) в эктопическом эндометрии относительно эутопического. Данные по дифференциальной экспрессии приведены на Рисунке 9. На диаграмме представлено графическое распределение дифференциально экспрессированных пивиРНК. В таблице на Рисунке 9 приведены списки дэ-пивиРНК в эндометриоидных кистах яичника, с указанием направления и кратности изменений, а также усредненного количества прочтений во всех исследуемых образцах.

Обращает на себя внимание преобладание в эктопическом эндометрии дэ-пивиРНК с пониженной экспрессией. Всего было выявлено 30 дэ-пивиРНК, среди которых 4 с повышенной и 26 с пониженной экспрессией.

Недавние исследования указывают на важную роль пивиРНК не только при гаметогенезе, но и при эмбриональном развитии и канцерогенезе. Нами был проведен функциональный анализ выявленных дифференциально экспрессированных пивиРНК. На первом этапе был проведен поиск потенциальных генов-мишеней дэ-пивиРНК при помощи базы данных piRNADB (www.piRNADB.org).

Таблица 23. Экспрессия пивиРНК в тканях эутопического и эктопического эндометрия.

Идентификатор	Число ридов
hsa-piR - 23626	22960
hsa-piR - 28763	22355
hsa-piR - 8871	9492
hsa-piR - 28765	9140
hsa-piR - 25624	8986
hsa-piR - 12655	8189
hsa-piR - 23019	7152
hsa-piR - 27435	7083
hsa-piR - 23127	6941
hsa-piR - 1119	5803
hsa-piR - 28340	5543
hsa-piR - 27080	4555
hsa-piR - 27306	4165
hsa-piR - 1028	4125



Идентификатор	Кратность изм.	Число ридов	p-value
hsa-piR-28466	2,71	198	0,026
hsa-piR-24128	2,36	68	0,005
hsa-piR-20180	2,39	36	0,008
hsa-piR-23164	3,12	17	0,005
hsa-piR-28763	-2,55	22355	0,021
hsa-piR-27080	-1,77	3989	0,005
hsa-piR-28400	-2,09	2174	0,028
hsa-piR-7006	-3,57	1874	0,001
hsa-piR-23444	-2,00	1406	0,013
hsa-piR-8871	-2,46	1087	0,000
hsa-piR-1091	-2,02	761	0,019
hsa-piR-1028	-1,99	749	0,008
hsa-piR-28734	-1,78	476	0,036
hsa-piR-28271	-1,99	385	0,047
hsa-piR-11621	-2,12	318	0,001
hsa-piR-5972	-2,40	270	0,013
hsa-piR-5970	-2,72	267	0,017
hsa-piR-27485	-2,39	204	0,014
hsa-piR-1082	-3,02	165	0,008
hsa-piR-19225	-2,21	64	0,043
hsa-piR-28059	-2,74	45	0,019
hsa-piR-13420	-1,89	36	0,036
hsa-piR-24553	-2,65	28	0,042
hsa-piR-28268	-3,95	26	0,000
hsa-piR-154	-1,93	16	0,047
hsa-piR-18881	-2,46	16	0,012
hsa-piR-14578	-3,92	16	0,005
hsa-piR-3381	-2,11	14	0,047
hsa-piR-3404	-2,82	12	0,011
hsa-piR-18867	-2,39	11	0,027

Рисунок 9. Дифференциальная экспрессия пивиРНК в тканях эндометриоидных кист яичника по сравнению с тканями эутопического эндометрия.

Таблица 24. Сигнальные пути и клеточные процессы, регулируемые потенциальными мишенями дифференциально экспрессированных пивирНК.

KEGG pathways	Path. size	Overlap	KEGG pathways	Path. size	Overlap
Онкологические процессы			Внутриклеточная сигнализация		
Pathways in cancer	322	5	p53 signaling	67	4
Prostate cancer	87	4	VEGF signaling	75	2
Melanoma	68	3	T cell receptor signaling	108	2
Bladder cancer	40	2	Neurotrophin signaling	124	2
Endometrial cancer	52	2	Wnt signaling	150	2
Non-small cell lung cancer	52	2	Jak-STAT signaling	154	2
Colorectal cancer	62	2	mTOR signaling	51	1
Glioma	63	2			
Pancreatic cancer	70	2			
Внутриклеточные процессы			Биосинтез и метаболизм		
Apoptosis	87	4	Pyrimidine metabolism	94	5
Cell cycle	122	3	Purine metabolism	158	5
Endocytosis	194	3	Glyoxylate / dicarboxylate met.	16	1
Axon guidance	128	2	Nicotinate / nicotinamide met.	24	1
Ubiquitin mediated proteolysis	133	2	Pentose phosphate pathway	26	1
Phagosome	144	2	Pyruvate metabolism	40	1
Reg. of actin cytoskeleton	208	2	Primary bile acid biosynthesis	16	1
Regulation of autophagy	33	1	Steroid biosynthesis	17	1

Полученные списки генов-мишеней использовали для обогащения по базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/kegg), включающей информацию об участии генов в путях внутриклеточной сигнализации.

Полученные списки генов-мишеней использовали для обогащения по базе данных KEGG, включающей информацию об участии генов в путях внутриклеточной сигнализации. В результате были выявлены пути и процессы, в которых принимают участие потенциальные мишени дэ-пивирНК. Репрезентативные данные анализа представлены в Таблице 24. По данным анализа, показано участие генов-мишеней в сигнальных каскадах p53, Wnt, mTOR, JAK-STAT, которые вовлечены в регуляцию клеточного деления и метаболизма. С этими каскадами могут быть связаны выявленные пути, задействованные в метаболизме сахаров и азотистых оснований. Обращает также на себя внимание присутствие процессов, ассоциированных с различными новообразованиями. Наличие ДЭП в тканях эндометрия может служить свидетельством их участия в патогенезе эндометриоза. Также необходимо отметить, что экспрессия пивирНК в эндометрии при эндометриозе ранее не изучалась.

Глава 4. Обсуждение полученных результатов

История изучения проблемы эндометриоза началась более 150 лет назад, но и по сей день это заболевание остаётся не до конца изученным; назначение гормональной терапии зачастую не имеет длительного лечебного эффекта, а одной из основных проблем является понимание причины возникновения его рецидивов [5, 19, 20].

Эндометриоз занимает основное место среди пролиферативных заболеваний органов малого таза, которое затрагивает практически все органы и системы организма, значительно ухудшая качество жизни женщин, а также является одной из причин ненаступления желанной беременности [186, 187, 188, 189, 190].

Данные статистики показывают, что необходимо дальнейшее углублённое изучение эндометриоза ввиду его высокой частоты встречаемости в мире. Всемирное общество по эндометриозу выдвинуло оптимистичный постулат: «Будущее поколение женщин – без эндометриоза» [97], однако для реализации этого проекта необходимо не только проводить лечение безопасными и надёжными медикаментозными препаратами, но и сделать упор в пользу профилактики возникновения рецидива заболевания, и, что немало важно, внедрить в клиническую практику высокочувствительные и малоинвазивные методы для диагностики эндометриоза, которые позволяли бы выявлять заболевание на доклиническом этапе.

Остается актуальной разработка ранней неинвазивной диагностики этого заболевания, так как зачастую начальные стадии НГЭ протекают бессимптомно. На сегодняшний день единственным методом ранней неинвазивной диагностики НГЭ является определение уровня СА-125 в крови женщин, однако специфичность данного метода составляет не более 70% [68, 71, 89, 90, 91, 97]. Малые размеры эндометриоидных очагов на ранних стадиях развития НГЭ не позволяют в полной мере использовать диагностические возможности визуальных методов диагностики (УЗИ, МРТ) [72, 73, 75, 118]. Таким образом, до настоящего времени

единственным точным методом диагностики эндометриоза является лапароскопия, на выполнение которой пациентки не всегда дают согласие [97, 192].

Выявление значимых клинических факторов развития эндометриоза и его рецидивов остаётся актуальным вопросом современной гинекологии. Определив достоверные маркеры прогнозирования и рецидивирования эндометриоза, возможно свести к минимуму риск повторного возникновения заболевания в будущем, оптимизировать сроки проведения как хирургического, так и медикаментозного лечения, уменьшить число больных с тяжелой формой заболевания, улучшить реализацию репродуктивной функции данной категории пациенток [71, 79, 187, 193].

В нашем исследовании проведена оценка результатов обследования, хирургического лечения 100 больных наружным генитальным эндометриозом на основе анализа данных предоперационной подготовки, характеристик операции, параклинических показателей, течения послеоперационного периода, ближайших и отдаленных результатов оперативного лечения, восстановления, реализации репродуктивной функции.

Средний возраст женщин с эндометриоидными кистами яичников составляет $30,27 \pm 3,78$, с ретроцервикальным эндометриозом $32,89 \pm 3,73$, что подводит к выводу, что эндометриомы яичников характерны для пациенток более молодого возраста. Так, в работе Si.Vannuccin подтверждается, что эндометриоидные кисты яичников образуются у женщин в раннем репродуктивном возрасте, что значительно ухудшает их качество жизни. Вместе с тем, чем моложе женщины, которые были прооперированы по поводу эндометриоза, тем выше вероятность рецидивирования заболевания и повторного оперативного вмешательства [194].

Основной жалобой у пациенток с НГЭ является хроническая тазовая боль. Именно боль, ассоциированная с эндометриозом, оказывает основное влияние на качество жизни пациенток. По данным литературы, временная потеря нетрудоспособности вследствие болевого синдрома при НГЭ приводит к потере нескольких миллионов рабочих дней, а лечение приводит к убытку в системе здравоохранения от 18 до 22 миллиардов долларов в год [2, 195].

Детальный анализ жалоб показал, что интенсивность болевого синдрома во многом зависела от локализации и распространенности эндометриоза. Так, основными жалобами пациенток с эндометриоидными кистами яичников были боли внизу живота регулярного характера у 41 (74,5%) женщины, дисменорея у 30 (54,5%), полименорея у 17 (30,9%) и бесплодие у 31 (56%). Пациентки с ретроцервикальным эндометриозом жаловались на болевой синдром – 41 (91,1%), диспареунию – 38 (84,4%), дисменорею - 27 (60,0%), бесплодие – 21 (47%) и полименорею – 18 (40,0%). Из этого следует, что диспареуния более свойственна больным с ретроцервикальным эндометриозом ($p < 0,05$).

Полученные нами данные удостоверяют одно из положений Глобального Консенсуса (2013 год): вопросы о наличии болевого синдрома и бесплодия в анамнезе должны стать рутинными в практике каждого врача [97].

Так, по данным Л.В. Адамян (2013), не всегда наблюдается корреляция между длительностью процесса, размерами гетеротопий и клинической картиной заболевания. К примеру, выраженный болевой синдром могут вызвать минимальные очаги эндометриоза на ректовагинальной перегородке или на брюшине малого таза, в то время как эндометриомы яичников больших размеров зачастую протекают бессимптомно и выявляются при диспансеризации [2].

Также не существует единого описания боли, и женщины с НГЭ испытывали разные болевые ощущения. Для оценки выраженности боли мы применяли визуальную аналоговую шкалу (ВАШ), по которой умеренные болевые ощущения выявлены у 30 (54,5%) женщин I группы и 17 (37,8%) II группы. А сильные боли отмечены у 11 (20%) и 24 (53,3%) больных, соответственно, $p < 0,001$. Средние показатели интенсивности боли при ретроцервикальном эндометриозе по ВАШ – $5,17 \pm 0,59$, что выше, чем в I группе - $4,69 \pm 0,41$.

Полученные данные показали, что при эндометриоидных кистах яичников болевой синдром менее выражен, чем у пациенток с ретроцервикальным эндометриозом, что не противоречит положению Глобального Консенсуса (2013 год) о том, что степень болевого синдрома не зависит от размера очага поражения и длительности его существования.

При оценке репродуктивной функции пациенток с эндометриозом первичное бесплодие встречалось чаще у пациенток с эндометриоидными кистами яичников – 28 (51%), чем у женщин с ретроцервикальным эндометриозом – 10 (22%), $p=0,004$. В то время как вторичное бесплодие выявлялось чаще у пациенток с ретроцервикальным эндометриозом – 11 (24%) в сравнении с эндометриоидными кистами яичников – 3 (5%), $p=0,007$.

По мнению А. Pellicer и других авторов [196, 197, 198], первичное бесплодие у женщин с эндометриомами яичников связано с подавлением фолликулогенеза и резким снижением числа примордиальных и растущих фолликулов, что в свою очередь приводит к нарушению овуляции, низкому качеству ооцитов, снижению потенциала оплодотворения, эмбрионам низкого качества и снижению частоты имплантации. При ретроцервикальном эндометриозе первичное бесплодие встречалось реже, так как инфильтрат не нарушал функцию яичников и не влиял на рост и созревание фолликулов.

Одним из факторов, влияющих на возникновение и развитие эндометриоза, является наследственность [174]. В обеих обследованных группах НГЭ в наследственном анамнезе встречался чаще, чем другие заболевания, причем у родственников пациенток с ретроцервикальным эндометриозом НГЭ отмечен в достоверно большем числе наблюдений – у 20 (44%), чем у женщин при эндометриоидных кистах яичников – 14 (25%), $p<0,05$. Полученные данные согласуются с результатами исследований К. Hansen и др. [199], которые обнаружили наследственную связь данного заболевания у близких родственников. По мнению авторов, данный факт подтверждает полигенность и многофакторность течения заболевания.

Все пациентки из групп исследования были прооперированы по поводу наружного генитального эндометриоза. Им было выполнено лапароскопическое оперативное лечение с иссечением всех эктопических очагов и их последующим гистологическим исследованием.

Необходимо радикально иссечь ретроцервикальные очаги с максимально бережным обращением с окружающими тканями. Этот подход необходим при

хирургическом лечении инфильтративного эндометриоза, так как иссечение очагов с помощью ножниц или биполяра, без использования других видов энергии сопровождается меньшей частотой рецидива заболевания [200]. Однако иссечение эндометриоидного инфильтрата при недостаточной подготовке хирурга и недостаточном знании анатомии органов малого таза может привести к повреждению нервных волокон и к нарушению функций тазовых органов. Поэтому для иссечения инфильтративного эндометриоза требуется высокий уровень подготовки хирурга и, соответственно, увеличивается время оперативного лечения.

Лапароскопическая цистэктомия по сравнению с лапароскопической аблацией (дренированием и коагуляцией стенки кисты) наиболее предпочтительна, вероятно, такой подход к оперативному вмешательству снижает риск рецидивирования эндометриоидных кист яичников, сохраняет фолликулярный запас и улучшает фертильность [201].

Во избежание излишнего удаления нормальной ткани яичников и негативного воздействия на овариальный резерв следует проявлять большую осторожность при отделении капсулы кисты от окружающей ткани. При больших объемах удаленной кисты и большой раневой поверхности наиболее предпочтительным методом гемостаза является ушивание ткани яичника, что позволяет сохранить овариальный резерв. Поэтому минимизация использования энергетических методов с целью гемостаза яичника обязательна [202].

Нами выполнено сравнение длительности оперативного лечения у пациенток исследуемых групп. У пациенток с эндометриоидными кистами яичников средняя продолжительность операции составила $60,11 \pm 3,70$ минут, у больных с ретроцервикальным эндометриозом – $96,33 \pm 7,38$ мин ($p < 0,001$). Было отмечено, что эндометриоз с ретроцервикальной локализацией сопровождается большими топографо-анатомическими нарушениями, тем самым поражая больше анатомических структур, за счет чего достоверно увеличивается время оперативного лечения.

В ходе исследования выявлено, что у женщин с ретроцервикальным эндометриозом кровопотеря во время оперативного лечения составляет $118 \pm 4,48$

мл и достоверно выше, чем у пациенток с эндометриоидными кистами яичников, у которых средняя кровопотеря равна $86 \pm 7,12$ мл ($p < 0,05$). Это вызвано тем, что инфильтративный эндометриоз характеризуется грубыми нарушениями анатомических структур, также в инфильтрат может быть вовлечен участок толстой кишки в области ректовагинальной перегородки.

При хирургическом лечении эндометриоза главной задачей хирурга является тотальное удаление всех очагов, но микроскопические и атипически расположенные гетеротопии могут быть не замечены и длительно персистировать. Поэтому после оперативного лечения 60% пациенток была назначена гормональная терапия. Препаратами выбора явились гестагены, чтобы минимизировать вероятность рецидива заболевания.

Частота рецидива НГЭ у наблюдаемых пациенток составила 21%, при этом в группе эндометриоидных кист яичников – 20%, при ретроцервикальном эндометриозе – 22,2%. Из полученных результатов следует, что частота возникновения рецидива не зависит от локализации очагов эндометриоза. Более того, в исследовании К. Nirgianakis [203] отмечается, что при последующей операции локализация эндометриоза будет та же, что и была ранее. Проспективное исследование в течение трех лет показало, что эндометриоз является прогрессирующим заболеванием [204]. Довольно часто рецидив заболевания сопровождается более тяжелой стадией поражения, инфильтративным прорастанием окружающих тканей, поэтому чем выше стадия исходного распространения заболевания, тем чаще впоследствии у прооперированных пациенток возникают тяжелые рецидивы. Тенденция к более тяжелым стадиям эндометриоза подразумевает, что прогрессирование заболевания может происходить со временем независимо от качества хирургического вмешательства [205]. Ссылаясь на данные литературы о факторах риска развития рецидива эндометриоза, мы полагаем, что в каждом случае необходимо оценивать уровень экспрессии маркеров в прогностических целях. У женщин, заинтересованных в реализации репродуктивной функции это, позволит сразу после операции не откладывать наступление беременности и безотлагательно решать вопрос о

возможности применения вспомогательных репродуктивных технологий. В связи с чем появляется повышенный интерес к выявлению действенных маркеров для диагностики и прогнозирования течения заболевания.

В последнее время активно ведутся исследования по поиску патогенетических и диагностических маркеров среди представителей малых РНК. С целью выявления микроРНК, участвующих в патогенезе эндометриоза, проводят профилирование и анализ их дифференциальной экспрессии в тканях эндометрия. В имеющихся на сегодняшний день исследованиях чаще всего проводят анализ дифференциальной экспрессии микроРНК в тканях эндометриоидных гетеротопий относительно тканей эутопического эндометрия, полученных от одного пациента (парные образцы), а также встречаются исследования, где сравнения проводят в непарных образцах, то есть в очаге эндометриоза одной пациентки относительно эндометрия контрольных групп, больных не страдающих эндометриозом. Для реализации данного подхода используются высокопроизводительные технологии, такие как гибридизация на микрочипах (Microarray) и секвенирование нового поколения (NGS). С помощью данных технологий возможно оценивать экспрессию большого количества микроРНК, а для секвенирования предполагается возможность определения экспрессии практически всех микроРНК в образце. В данной работе для оценки экспрессии малых РНК был применен метод высокопроизводительного секвенирования. Дифференциально экспрессированные микроРНК отбираются на основе статистически значимых изменений, значения которых могут варьировать в разных исследованиях, но чаще всего отбираются кандидаты с измененной экспрессией в 1,5-2 раза. Также при секвенировании важным параметром является количество прочтений для каждой микроРНК, по которому можно судить об ее относительной представленности в исследуемом образце. Считается, что даже небольшие различия в уровнях экспрессии микроРНК могут иметь биологически значимые последствия; таким образом, большая величина кратности изменений не обязательно необходима для наблюдения биологического эффекта. Тем не менее, до настоящего времени не выработано обоснованных критериев отбора значимости величины изменений и количества

прочтений, поэтому данные параметры до сих пор отбираются авторами эмпирически. В нашем исследовании кандидатные микроРНК отбирались при значении кратности изменений большем или равном двум и количестве прочтений (среднем для всех образцов сравниваемых групп) большем или равном ста.

Как правило, различия в уровнях экспрессии микроРНК, выявленные методом секвенирования, подтверждаются альтернативными методами, например ПЦР в реальном времени. В нашем исследовании были отобраны несколько микроРНК в разном диапазоне количества прочтений и кратности изменений и их экспрессия была проверена методом ПЦР. Для выбранных микроРНК был показан схожий характер изменений параметров экспрессии, полученных при ПЦР и секвенировании.

За последнее десятилетие было опубликовано около двадцати исследований профилей экспрессии микроРНК в тканях эндометрия. Wei и его коллеги (2015) провели мета-анализ 12 исследований профилирования экспрессии микроРНК, на основании которого сообщили об обнаружении в общей сложности 134 ДЭМ, 28 из которых были обнаружены в двух или более исследованиях [206]. На сегодняшний день опубликованы данные трех работ, где экспрессия микроРНК изучалась методом секвенирования в тканях эндометрия при НГЭ. Начиная с 2014 года, было проведено по меньшей мере шесть скрининговых исследований (с использованием микрочипов и секвенирования) для выявления отличий в экспрессии микроРНК в эндометриоидных очагах [207, 208, 209] и в кистах яичников в сравнении с эутопическим эндометрием [210], а также в эутопическом эндометрии при эндометриозе в сравнении с контрольной группой [211].

В недавнем обзоре Saare и коллеги подчеркивают тканевую гетерогенность образцов, используемых для сравнения, выделяя следующие пары сравнения: 1) парные и непарные образцы тканей очага и образцы тканей эутопического эндометрия, 2) ткань эндометрия от пациенток с эндометриозом и ткани эндометрия от пациенток без эндометриоза 3) очищенные клеточные фракции из эндометриоидных гетеротопий и ткани эндометрия [212].

Хайкалис и его коллеги (2018) количественно определили уровни шести микроРНК при различных локализациях эндометриоза (эндометриоидные кисты яичников, перитонеальные и глубокие инфильтративные поражения) и сообщили о профилях экспрессии, характерных для каждого типа поражения [213].

Важно отметить, что для каждого исследования характерны списки ДЭМ, которые значительно отличаются друг от друга. Однако в последнее время активно ведется поиск молекулярных маркеров и появляется все больше информации, за счет чего растет количество данных и начинают появляться списки микроРНК [210], наиболее часто встречающиеся в большинстве исследований.

Необходимо учитывать, что экспрессия микроРНК может варьировать в связи со сменой фаз менструального цикла, когда клетки эндометрия либо активно пролиферируют, либо вступают в стадию дифференцировки с последующей дегенерацией. Так, в эпителиальных клетках эндометрия экспрессия ряда микроРНК (miR-193a-3p, -203, -204, -200c, -210 -29b, -29c, -30b, -30d, -31, -345, -582-5p) повышалась в секреторной фазе по сравнению с пролиферативной фазой [214]. Также наблюдалось снижение экспрессии представителей семейств микроРНК miR-181, -183, -200 в процессе децидуализации [215]. Таким образом, вариабельность результатов различных исследований по экспрессии микроРНК в эндометрии больных эндометриозом, может быть вызвана колебаниями менструального цикла, если образцы из разных фаз были проанализированы вместе. Более того, в некоторых исследованиях соответствующая информация о фазах менструального цикла отсутствует, что также мешает однозначной оценке полученных данных. Также не исключается влияние локализации очага на представленность тех или иных микроРНК.

В этой связи в нашем исследовании была проведена оценка различий в экспрессии микроРНК в эндометриоидных кистах яичников и ретроцервикальных гетеротопиях в сравнении с эутопическим эндометрием больных эндометриозом и женщин без данной патологии. Также была проведена оценка экспрессии микроРНК в исследуемых тканях эндометрия в зависимости от фазы цикла. Были выявлены существенные различия в экспрессии микроРНК в зависимости от

локализации очага и фазы менструального цикла. Следует подчеркнуть, что профилирование микроРНК в очагах ретроцервикального эндометриоза ранее не проводилось.

В нашем исследовании было показано значительное отличие в наборах микроРНК в зависимости от фазы цикла как при ретроцервикальном эндометриозе, так и при эндометриоидных кистах яичников. В ранних работах дискутировался вопрос об отсутствии выраженного влияния гормональных перестроек, связанных со сменой фазы цикла, на экспрессию микроРНК в эндометрии. Отчасти это было связано с небольшим количеством исследованных микроРНК, а также с тем, что в большинстве работ авторы проводили исследования на образцах, полученных в одну фазу цикла.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют не только выраженные отличия экспрессии микроРНК по фазам, но также и по локализациям. Данные различия могут быть связаны с тканевым окружением эндометриоидных гетеротопий как функционально, так и гистологически, поскольку окружающие ткани часто интимно сращены с очагами, и при выделении могут составлять часть получаемого образца.

Полученные данные по экспрессии микроРНК наглядно демонстрируют, что при подборе образцов, анализе и сравнении данных обязательно необходимо учитывать локализацию, тип контрольной группы, фазу и продолжительность цикла. Подбор материала с учетом распределения по этим параметрам необходим для сопоставимости данных, полученных в разных исследованиях.

Дальнейший анализ списков ДЭМ и их пересечение позволило выявить микроРНК со сходными изменениями экспрессии вне зависимости от локализации и/или от фазы цикла.

По данным ряда публикаций был сформирован список микроРНК, дифференциальная экспрессия которых в эндометриоидных очагах была показана в трех или более исследованиях: hsa-miR-1, -29c, -34c, -100, -141, -145, -183, -196b, -200a, -200b, -200c, -202, -365 и -375 [212]. Из этого списка в нашем исследовании были выявлены микроРНК miR-145, -183, -196b, -200a, -200b, -200c, -34c,

экспрессия которых наблюдалась в очагах различной локализации, как в пролиферативную, так и в секреторную фазу менструального цикла. С учетом того, что в ранних исследованиях анализ экспрессии проводился в очаге одной локализации и только в одну фазу цикла или без ее указания, выявление данных микроРНК во всех работах (использовавших разные методические подходы для идентификации) свидетельствует о наиболее вероятном участии данных ДЭМ в патологических процессах при эндометриозе. По имеющимся данным известно, что некоторые микроРНК участвуют в эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), а также в регуляции ангиогенеза, клеточной пролиферации, клеточной адгезии и инвазии [212, 216]. Как ЭМТ, так и ангиогенез считаются ключевыми патофизиологическими компонентами в формировании эндометриоидных очагов. ЭМТ участвует в миграции и инвазии клеток во время формирования очага, и вновь возникшие очаги требуют кровоснабжения для поддержания их роста.

Одной из таких микроРНК, обнаруженной и в нашей работе, является hsa-miR-200b, дифференциальная экспрессия которой была ранее выявлена в эндометрии [212], в эндометриоидных кистах яичников [207, 217, 218] и эндометриоидных очагах [208, 209, 219]. По данным ряда авторов известно, что miR-200b играет функциональную роль в эпителиально-мезенхимальной трансформации, которая является важным патогенетическим процессом при эндометриозе [58, 214]. Известно, что семейство микроРНК miR-200 также играет важную роль в метастазировании при раке яичников [215].

Ключевыми мишенями семейства miR-200 также являются транскрипционные факторы ZEB1 и ZEB2, обеспечивающие, в частности, регуляцию уровня экспрессии белка клеточной адгезии эпителиальных клеток E-кадгерина. При усилении экспрессии представителей семейства miR-200 наблюдается уменьшение экспрессии транскрипционных факторов ZEB1 и ZEB2, что приводит к увеличению экспрессии белка E-кадгерина, который обеспечивает поддержание эпителиального фенотипа [220]. Было показано, что фенотип эпителиальных клеток контролируется сигнальным каскадом TGF- β , с участием

miR-200 и ZEB [61], и Wnt/ β -катениновым путем (рассмотренным в работе [58]). Во время процесса ЭМТ, эпителиальные клетки теряют свои специфические особенности и приобретают мезенхимальный фенотип, что приводит к усилению клеточной инвазии и миграции [220]. Помимо регуляции ЭМТ и инвазивного поведения клеток, повышенная регуляция miR-200b в эндометриотической клеточной линии 12Z также увеличивала экспрессию транскрипционного фактора KLF4 и тем самым усиливала пролиферацию эндометриальных клеток и связанный со стволовостью побочный популяционный фенотип *in vitro* [221].

Вышеупомянутые исследования микроРНК при эндометриозе подтвердили значительное снижение уровня miR-200b при эндометриоидных кистах яичников и перитонеальных поражениях по сравнению с эндометрием. В нашем исследовании также наблюдалось снижение данной микроРНК в эндометриоидных кистах яичников и очагах ретроцервикального эндометриоза.

В ранних исследованиях также сообщалось о снижении регуляции других членов семейства miR-200 miR-200a и miR-200c. По нашим данным экспрессия данных микроРНК также снижена и не зависит от локализации и фазы цикла.

В работе Saare M., было установлено увеличение экспрессии представителей семейства miR-200 (miR-200a, miR-200) в клетках эпителия нормального эндометрия наблюдается повышенная в эпителиальных клетках, что может свидетельствовать о тканеспецифичном характере экспрессии данных микроРНК [222]. Можно предположить, что выявление пониженной экспрессии представителей семейства miR-200 в эндометриоидных гетеротопиях может указывать на снижение в них доли эпителиальных клеток. Недавнее исследование, в котором проводили анализ экспрессии микроРНК в клетках, выделенных из эутопического эндометрия [223], показало повышенную экспрессию miR-200b в стромальных клетках больных эндометриозом при сравнении с контрольной группой, тогда как в эпителиальных клетках различий в экспрессии не наблюдалось. В нашем исследовании также проводился анализ экспрессии микроРНК в стромальных клетках эктопического и эутопического эндометрия. Было показано, что в отличие от тканей, экспрессия представителей семейства miR-

200 достоверно не отличается в стромальных клетках обеих локализаций. Что может свидетельствовать в пользу высказанных предположениях относительно представленности эпителиальных клеток в эктопическом эндометрии. Кроме этого, нельзя отрицать возможность экспрессии представителей данного семейства другими клетками в ткани эндометрия, в частности лейкоцитами.

Другой микроРНК с повышенной экспрессией в тканях эндометриоидных гетеротопий является miR-145, в частности ее транскрипционные варианты miR-145-5p и miR-145-3p [207, 209, 217, 219]. В ряде работ установлено, что данные микроРНК участвуют в стимуляции апоптоза пролиферирующих раковых клеток, а также способны блокировать инвазию и метастазирование (обзор приведен в работе [224]). Adamnek и соавт. [51]. показали, что микроРНК-145 ингибирует пролиферацию клеток эндометрия, а также их инвазивность и формирование стволового фенотипа через регулирование экспрессии элементов цитоскелета, молекул клеточной адгезии, протеолитических факторов и генов плюрипотентности (ACTG2, CT4, FASCIN1, JAMA, KLF4, PODXL, SERPINE1, SOX2, TAGLN). Однако некоторыми исследователями значение miR-145 в патогенезе опухолевого роста ставится под сомнение [62]. Например, в эпителиальных клетках толстой кишки и в клетках рака толстой кишки не было выявлено изменений экспрессии miR-145, тогда как повышение ее экспрессии отмечалось в гладкомышечных клетках и фибробластах, что может свидетельствовать об изменении клеточного состава опухоли, а не об изменении экспрессии miR-145 в раковых клетках [62]. В эндометриоидных гетеротопиях также присутствуют гетерогенные популяции различных клеток, в частности из окружающих тканей, которые могут отсутствовать в эктопическом эндометрии. В этой связи, изменение уровня экспрессии miR-145 в эндометриоидных очагах может быть связано с разным клеточным составом образцов тканей.

Тем не менее, в проведенном нами исследовании было установлено, что как в тканях эндометриоидной кисты яичника, так и в выделенных из нее стромальных клетках, экспрессия miR-145-3p была повышенной, что может свидетельствовать в пользу ее участия в патогенезе эндометриоза.

Для поддержания тканевого гомеостаза необходимы правильно функционирующие и строго контролируемая регуляция процессов апоптоза, поэтому любые нарушения в этом процессе могут в конечном итоге оказаться потенциально патогенными. МикроРНК являются одними из ключевых регуляторов апоптоза путем положительной или отрицательной регуляции экспрессии анти- или проапоптотических генов [225]. При эндометриозе устойчивость к апоптозу рассматривалась как одна из возможных причин, по которой клетки эндометрия могут выживать в эктопических локализациях [226]. В ряде работ, а также в нашем исследовании, было обнаружено изменение экспрессии одной из антиапоптотических микроРНК miR-183 в эктопическом эндометрии [217, 207, 208]. Данная микроРНК также регулирует многие другие важные клеточные процессы, которые, как считается, участвуют в патогенезе эндометриоза, такие как рост клеток, дифференцировка, подвижность, клеточная адгезия и инвазия [227, 228]. Функциональный анализ подтвердил, что miR-183 играет стимулирующую роль в апоптозе и отрицательно регулирует инвазивность стромальных клеток, хотя и не оказывает влияния на их пролиферацию [18]. Chen et al. [208] подтвердили, что интегрин $\beta 1$ (ключевой фактор клеточной адгезии и инвазивности) является геном-мишенью miR-183, и предположили, что miR-183 может оказывать отрицательное регуляторное воздействие на инвазивность клеток, а сверхэкспрессия интегрин $\beta 1$ блокирует ответные эффекты miR-183 на инвазивность стромальных клеток. Экспрессия miR-183 в стромальных клетках также изучалась в ответ на овариальные стероиды (17 β -эстрадиол и прогестерон) и воспалительные цитокины (фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-6). Введение всех этих реагентов снижало экспрессию miR-183. Из этого исследования был сделан вывод, что подавленные уровни miR-183 могут модулировать рост и инвазивный потенциал эндометриотических стромальных клеток эндометрия, способствуя развитию и прогрессированию эндометриоза [208].

В работе Corney et al. (2007) было показано снижение экспрессии представителей семейства miR-34 в эктопическом эндометрии. Функциональные исследования показали, что miR-34b и miR-34c действуют как медиаторы p53-

зависимого подавления пролиферации. Анализ генов-мишеней данных микроРНК и дальнейшее их обогащение по путям внутриклеточной сигнализации продемонстрировали потенциальное участие целевых генов в регуляции клеточного цикла. Авторы предположили, что изменение экспрессии miR-34c и miR-34b в эндометриоидном очаге может быть вовлечено в поддержание пролиферативного потенциала клеток эндометрия. В проведенном нами исследовании экспрессии микроРНК в стромальных клетках также был установлен пониженный уровень miR-34c в клетках эктопического эндометрия, что также согласуется с показанным снижением тканевой экспрессии. Таким образом, истинная значимость экспрессии различных представителей семейств микроРНК в патогенезе эндометриоза должна быть подтверждена в будущем сравнением чистых популяций клеток эутопического и эктопического эндометрия, в частности для определения вклада каждого клеточного компонента и выявления мишеней таргетного терапевтического воздействия.

В ходе выполнения экспериментальных работ по созданию библиотек малых РНК, полученных из образцов тканей, нами было отмечено присутствие олигонуклеотидов с длиной большей чем у микроРНК в диапазоне 25-35 нуклеотидов. Данная длина нуклеотидной цепи соответствует еще одному классу малых некодирующих РНК – piwiRNA (piRNA или пивиРНК). пивиРНК взаимодействуют с белком PIWI с образованием комплекса piRISC (piRNA-induced silencing complex), который обеспечивает ингибирование экспрессии транспозонов при гаметогенезе. Помимо этого, появляются данные о том, что пивиРНК могут взаимодействовать с мРНК не только при гаметогенезе, но и в соматических клетках и модулировать экспрессию белков по механизму, аналогичному микроРНК. Для проверки гипотезы о присутствии представителей малых РНК данного класса в тканях эндометрия было проведено секвенирование образцов, полученных от больных с эндометриоидными кистами яичников. Анализ полученных после секвенирования прочтений показал довольно выраженную представленность пивиРНК в тканях эндометрия. Были установлены дифференциально экспрессирующиеся пивиРНК, с преобладанием снижения

экспрессии в тканях эктопического эндометрия [299]. По данным анализа литературных источников экспрессия пивиРНК в эндометрии и при эндометриозе не изучалась. Поэтому полученные данные носят приоритетный характер и могут предоставить полезную информацию для будущих исследований по определению потенциального участия специфических пивиРНК в патогенезе эндометриоза.

Роль пивиРНК и взаимодействующих с ними белков активно изучается в последнее время в качестве возможного патогенетического звена при канцерогенезе. Так, было показано, что увеличение экспрессии представителей семейства HIWI-белков (аналоги PIWI-белков у человека), взаимодействующих с пивиРНК, коррелировало с развитием ряда опухолей [171, 229, 230, 231], а ингибирование экспрессии HIWI-белков приводило к снижению пролиферации опухолевых клеток [232]. Также некоторыми исследователями было продемонстрировано [233] изменение экспрессии ряда пивиРНК в тканях рака желудка, толстой кишки, легких и молочной железы по сравнению с нормальными соседними тканями, что указывает на их потенциальную роль в регуляции пролиферации и опухолевого роста [164, 232, 234]. Полученные данные находят свое подтверждение в результатах недавней работы, где было описано изменение экспрессии пивиРНК специфичное для фазы клеточного цикла в клетках регенерирующей печени [233].

Экспрессия HIWI-белков была также показана при раке эндометрия [235], однако экспрессия самих пивиРНК в тканях эндометрия оставалась мало изученной. В недавней работе M. Ravo и соавторов методом секвенирования было установлено достоверное изменение экспрессии десяти пивиРНК в тканях при раке эндометрия, по сравнению с нормальными тканями [236]. Авторы предположили, что дифференциально экспрессированные пивиРНК могут оказывать модулирующее действие на несколько сигнальных путей, таких как ERK / MAPK, TGF- β и Wnt/ β -Катенин, активация которых наблюдается уже при формировании гиперплазий, и становится наиболее выраженной при раковой трансформации. Поскольку роль пивиРНК в патогенетических процессах до настоящего времени не изучалась, можно предположить, что идентифицированные в данной работе дэ-

пивиРНК также могут оказывать аналогичное действие при эндометриозе, поскольку по данным биоинформатического анализа выявленные пивиРНК способны модулировать сходные пути внутриклеточной сигнализации, ответственные за пролиферацию и дифференцировку клеток.

После проведения транскриптомных исследований с выявлением дифференциальной экспрессии малых РНК, их специфическая роль может быть проверена в функциональных исследованиях. В частности, эффект повышенной или пониженной экспрессии индивидуальной микроРНК может тестироваться в клеточных линиях или первичной культуре стромальных клеток эндометрия человека. Культивируемые клетки обрабатывают ингибиторами, которые подавляют экспрессию конкретной микроРНК, или экзогенной микроРНК для имитации ее сверхэкспрессии, а затем измеряют уровни экспрессии (мРНК и белок) прогнозируемых мишеней или оценивают клеточные фенотипы, имеющие отношение к патофизиологии эндометрия, такие как: пролиферация, адгезия, миграция, инвазивность, воспалительная сигнализация или сигнализация эстрогена и прогестерона. Такой подход оправдан для изучения роли отдельных микроРНК, однако при наличии больших списков ДЭМ данный подход не осуществим. Тем не менее, результаты профилирования, в частности, полученные в нашей работе, являются важным шагом для отбора кандидатных микроРНК и для дальнейшего подтверждения их роли в функциональных экспериментах *in vitro*.

Функциональные показатели дисрегуляции микроРНК могут быть предсказаны биоинформатическими инструментами [237]. По данным проведенных ранее исследований с использованием биоинформационного анализа наиболее распространенным путем, на который могут влиять мишени микроРНК, была клеточная пролиферация. Другие пути, на которые влияет дисрегуляция микроРНК, связаны с апоптозом, ангиогенезом, адгезией клеток, инвазией или миграцией, продукцией воспалительных цитокинов и сигнализацией стероидных гормонов (сигнализация эстрогенов или резистентность к прогестерону).

Наиболее часто идентифицируемой мишенью микроРНК, связанных с эндометриозом, был VEGFA или сосудистый эндотелиальный фактор роста А,

который, как оказалось, регулируется пятью микроРНК. Этот сигнальный белок стимулирует ангиогенез и участвует в формировании кровеносных сосудов при поражении эндометриозом. Регуляция ангиогенеза с участием микроРНК, была показана в исследованиях, связанных с изучением канцерогенеза [238]. В исследованиях экспрессии различных микроРНК при эндометриозе, связанных с ангиогенезом, также было показано, что уровни VEGFA различаются в зависимости от типа эндометриоидного очага. Более высокие уровни белка VEGFA обнаруживается в перитонеальных имплантатах и ректовагинальных очагах по сравнению с эндометриомами, что предполагает более активный ангиогенез в первых двух типах гетеротопий [207, 239]. Антагонисты рецепторов VEGF и другие антиангиогенные агенты были исследованы в качестве лекарственных средств для лечения эндометриоза [240]. На животных моделях заболевания было показано, что антиангиогенные препараты подавляют рост эндометриоидных имплантов и уменьшают количество и объем очагов [240].

Матриксные металлопротеиназы (ММП-3 и ММП-9) и тканевой ингибитор металлопротеиназ (ТИМП) также выявлялись в качестве мишеней микроРНК, ассоциированных с эндометриозом. Эти протеолитические ферменты разрушают внеклеточный матрикс, способствуя ремоделированию тканей и инвазии клеток эндометрия в перитонеальную ткань [241]. Измененная экспрессия ММП и ТИМП была выявлена в эутопическом и эктопическом эндометрии, а также было показано, что повышение активности ММП усиливает инвазивность клеток эндометрия *in vitro* [242, 243]. Эксперименты по профилированию экспрессии микроРНК и мРНК из изолированных эутопических стромальных клеток эндометрия также выявили несколько мишеней микроРНК, измененных у женщин с эндометриозом: ZEB1, MMP7 и TGFβ1 [223]. Последний участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе и регулируется несколькими микроРНК [214].

В недавней работе был проведен анализ профилей экспрессии как микроРНК, так и мРНК в образцах тканей эндометриоидных кист яичника и эутопического эндометрия [210]. С помощью биоинформационного анализа были идентифицированы связи факторов транскрипции с пятью регуляторными

кластерами микроРНК, включая семейство miR-200, которые осуществляли взаимодействие с шестью семействами транскрипционных факторов [210]. Таким образом, биоинформационный анализ продолжает служить основой как для экспериментального проектирования функциональных исследований на клеточных моделях, так и инструментом для определения возможных терапевтических мишеней.

Известно, что отдельные микроРНК регулируют экспрессию множества различных генов-мишеней (на уровне мРНК) в клетках, которые вместе с кодируемыми ими белками могут быть связаны общими клеточными путями. Чтобы определить механизмы, с помощью которых ДЭМ влияют на физиологию клеток, существует множество вычислительных алгоритмов и биоинформационных инструментов, доступных для идентификации потенциальных мишеней каждой ДЭМ и отображения функции этих целевых генов на клеточные пути и процессы. В обзоре Wai и др. (2015) использовали четыре метода для определения потенциальных мишеней микроРНК, выявленных в нескольких исследованиях: TargetScan, PicTar, miRanda и miRDB-на микроРНК. Затем авторы описали биологические процессы и пути, в которых участвуют эти гены, с помощью веб-инструмента GeneCodis [206]. В общей сложности было идентифицировано 9882 генов-мишеней микроРНК, а анализ обогащения генов и геномов KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes) и Panther pathways показал пути, преимущественно связанные с раком и Wnt сигнальным каскадом, а также с процессами эндоцитоза и ангиогенеза [206]. Filigheddu et al (2010) выявили целевые мРНК для набора ДЭМ помощью TARGETSCAN и PICTAR-VERT, получив более 3000 мишеней, функции которых в дальнейшем были картированы и идентифицированы молекулярные пути с помощью программного пакета Ingenuity IPA 7.5 [217].

Необходимо отметить, что авторы цитируемых работ использовали все потенциальные (валидированные и предсказанные) гены-мишени ДЭМ, количество которых варьировало от трех до девяти тысяч. Данный подход существенно увеличивает количество возможных сигнальных путей, потенциально

регулируемых ДЭМ, что может затруднять определение значимых для патогенеза эндометриоза процессов.

В нашем исследовании с использованием биоинформационных баз данных проводился отбор генов-мишеней ДЭМ на основании информации о валидации их взаимодействий, подтвержденной не менее чем тремя различными методами. Таким образом, был получен список генов-мишеней, функция которых с высокой вероятностью может быть изменена выявленными ДЭМ. Проведенное обогащение по данному списку также с высокой вероятностью определяет пути значимо участвующие в патологическом процессе. В нашем исследовании обогащение проводилось как по спискам ДЭМ при ретроцервикальном эндометриозе, так и при эндометриоидных кистах яичников. Из полученных списков путей и процессов были отобраны общие для обеих локализаций. В результате было установлено, что валидированные гены мишени ДЭМ входят в состав клеточных процессов и сигнальных каскадов, активируемых эстрогенами, пролактином, тиреотропином, факторами роста и морфогенными регуляторами. Проведенное обогащение по генам-мишеням ДЭМ в тканях и стромальных клетках при эндометриозе яичников выявило сходные процессы и пути внутриклеточной сигнализации, регулируемые интерлейкинами, эстрогенами, фолликулостимулирующим гормоном, лептином, пролактином и тиреотропином.

Одним из путей, обнаруженных как в тканях, так и в клетках, является сигнальный путь, запускаемый трансформирующим фактором роста бета (TGF- β). Активация TGF- β соответствующего рецептора (TGFBR2) приводит к образованию комплекса белков семейства Smad, их последующей транслокацией в ядро, что обеспечивает регуляцию транскрипции целевых генов [244]. Сигнальный путь, запускаемый TGF- β /Smad реализуется с участием митоген-активированный протеин киназы (MAPK), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), киназ p38 и c-Jun (JNK). Считается, что активация TGF- β пути играет важную роль в формировании фиброзных изменений. Повышение секреции TGF- β наблюдается в ходе репаративных процессов, что служит стимулом для клеточной трансдифференцировки в миофибробласты и может приводить к аномальному

накоплению внеклеточного матрикса [245]. Миофибробласты, характеризуются повышенным уровнем метаболизма, экспрессией гладкомышечного актина (α -SMA), а также повышением продукции коллагенов I, III, V и VI типа, участвующих в формировании фибротических изменений и развитии рубцовой ткани [246]. Участие миофибробластов в процессах фиброобразования также подтверждается данными по повышенной секреции ими тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ, которые обеспечивают деградацию фибриллярных компонентов межклеточного вещества [247, 248].

В ряде работ было показано, что при фиброзе тканей эндометрия происходит усиление TGF- β сигнализации. Данное явление как в моделях на животных, так и у пациенток, страдающих эндометриозом, что позволяет рассматривать TGF- β сигнальный каскад в качестве ключевого фактора фиброобразования тканей при данном заболевании [249, 250]. Так было показано, что при моделировании фиброза у грызунов в тканях эндометрия наблюдалось увеличение экспрессии TGF- β , CTGF, α -SMA, коллагенов I и III типа. TGF- β сигнальный путь может оказывать перекрестное воздействие на смежные пути, к которым относятся CTGF и Wnt сигнальные каскады [251]. Фактор роста соединительной ткани играет важную роль в процессах формирования соединительной ткани, ангиогенезе и остеогенезе. CTGF также рассматривается в качестве эффектора пути TGF- β и может участвовать в развитии фиброза [252, 253]. Снижение экспрессии CTGF приводит к замедлению фиброгенеза за счет торможения синтеза коллагена I, запускаемого при действии TGF- β [254]. Роль данных факторов роста при фиброзе была показана в работе Хие и соавторов [255], где наблюдалось увеличение экспрессии CTGF и TGF- β в эндометрии у больных с внутриматочным спаечным процессом. Авторы также показали, что пациенты с повышенным уровнем экспрессии этих факторов роста демонстрировали повышенный риск рецидива, что указывает на возможность применения данных маркеров в качестве потенциальных предикторов рецидива фиброза эндометрия.

Таким образом, TGF- β рассматривается в качестве основного фактора развития фиброзных изменений при эндометриозе, способствующего

трансдифференцировке стромальных клеток в миофибробласты через Smad-зависимые и Smad-независимые сигнальные пути [256]. Кроме этого, TGF- β участвует в эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток эктопического эндометрия, что приводит к повышению их миграционной активности [257, 258]. В результате модулирование сигнальных каскадов TGF- β , способно ингибировать превращение в миофибробласты и тормозить процессы ЭМТ. Специфическое воздействие на сигнальные пути TGF- β может рассматриваться в качестве потенциального подхода в терапии эндометриоза [259, 260].

Развитие спаечного процесса при эндометриозе в значительной мере ассоциировано с тканевым воспалением. Было установлено, что формирование спаек и степень тяжести эндометриоза коррелировали с увеличением продукции ряда факторов роста и провоспалительных цитокинов, таких как TGF- β , VEGF, TNF- α , IL-1, IL-6 [261, 262]. В настоящее время считается, что одним из ключевых патогенетических факторов эндометриоза является формирование провоспалительного микроокружения в процессе развития эктопического эндометрия.

В результате обогащения генов-мишеней микроРНК были установлены пути, запускаемые различными интерлейкинами (Таблица 18, 19). Изменение экспрессии некоторых интерлейкинов в эктопическом эндометрии было показано ранее в ряде работ. В частности, было показано снижение экспрессии интерлейкинов -5, -7, -9 и одновременное повышение экспрессии интерлейкина-2 в эктопическом эндометрии [263]. В эндометриоидных гетеротопиях также наблюдалась повышенная экспрессия рецептора интерлейкина-1, что может свидетельствовать об изменении регуляторных влияний интерлейкина-1 в воспалительных процессах [264]. Изменение активности сигнальных путей интерлейкина-1 (IL1) может приводить к изменению сигнализации другими интерлейкинами. Установлено, что IL1 оказывает влияние на секрецию IL6 и IL8 различными клетками, встречающимися в тканях эндометрия [265, 266]. Секреция IL6 и IL8 и активация их сигнальных путей может участвовать в формировании воспалительного ответа в результате активации и миграции лейкоцитов. Была также показана роль

эстрогенов в секреции IL6 клетками эндометрия. При этом секреция эстрогенов в тканях эндометрия повышалась при стимуляции IL1 и TNF-а [258].

Другой мишенью IL1 может быть циклооксигеназа-2 (ЦО-2), экспрессия которой усиливается в тканях эндометрия при повышении экспрессии рецептора IL1, или снижении экспрессии его антагониста, что впоследствии может приводить к избыточной продукции простагландинов [267, 268]. Образование простагландинов, в частности простагландина E2 (ПГЕ2) может индуцировать экспрессию ароматазы, которая необходима для синтеза эстрогенов, и дополнительно стимулировать образование ЦО-2 [269], что может приводить к повышению локального уровня простаноидов и эстрогенов в тканях эндометрия. Повышение уровня ПГЕ2 также может приводить к усилению фагоцитарной активности иммунокомпетентных клеток и увеличению экспрессии VEGF с последующей стимуляцией ангиогенеза, что может способствовать развитию эндометриозидных очагов.

Значимый вклад в тканевое воспаление при эндометриозе могут вносить IL5, продуцируемый, в частности, тучными клетками при аллергических реакциях [270], а также IL7, который повышает продукцию воспалительных хемокинов, таких как MIP-1beta (macrophage inflammatory protein). Повышение продукции IL7 в тканях было также показано при аутоиммунных заболеваниях [271]. Также при аутоиммунных процессах наблюдалось изменение экспрессии IL2, IL10. На возможность развития аутоиммунных реакций указывают данные об изменении активности В-клеток и повышении продукции аутоантител у пациенток с эндометриозом. Были выявлены различные антитела специфичные гистоновым белкам, фосфолипидам, и антигенам клеток яичников и эндометрия [272]. Можно предположить, что изменение баланса иммунных реакций в тканях эндометриозидных гетеротопий способствует активации и пролиферации клеток эндометрия, тканевых лейкоцитов и образованию аутоантител. Активация клеток эктопического эндометрия и секреция ими факторов роста и цитокинов, может влиять на соседние ткани за счет усиления образования радикальных форм кислорода и развитию окислительного стресса.

В результате проведенного биоинформатического анализа было показано обогащение путей внутриклеточной сигнализации, ассоциированных с адаптивными ответами, вызванными повреждением ДНК. Данные пути запускаются, в частности, при дестабилизации генетического аппарата, в результате генотоксического воздействия окислительного стресса на клетки, ключевым фактором развития которого является процесс воспаления в тканях эктопического эндометрия.

Полученные данные согласуются с результатами работ, где было продемонстрировано повышение уровня перекисного окисления липидов и окисления ДНК в клетках гранулезы у больных с эндометриоидными кистами яичника. Также было установлено, что при окислительном стрессе происходит повреждение как геномной, так и митохондриальной ДНК. Таким образом, генотоксическое действие окислительного стресса может вносить значимый вклад в снижении фертильности при эндометриоидных кистах яичников [273]. Данное утверждение подтверждается результатами исследования, где была показана дефрагментация ДНК в клетках, инкубировавшихся в присутствии перитонеальной жидкости больных эндометриозом. При этом выраженность повреждений ДНК коррелировала, как с длительностью экспозиции, так и с тяжестью заболевания [274].

Ключевым эффектором в формировании клеточного ответа на повреждение ДНК является белок p53, который является ключевым для нескольких путей сигнализации, объединенных в единую сеть (TP53 network). Белок p53 участвует как в остановке клеточного цикла, так и в запуске процессов апоптоза в случае, когда клетка неспособна осуществить репарацию. По данным нашего исследования также выявлялись гены-мишени микроРНК, участвующие в реализации активности сети TP53, что может свидетельствовать о регуляторной роли микроРНК в адаптации к окислительному стрессу.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно выделить несколько потенциальных мишеней терапевтического воздействия с точки зрения сигнальных каскадов и процессов: пути запускаемые TGF - β , клеточные

коммуникации, запускаемые цитокинами, а также компоненты каскадов, активируемые окислительным стрессом, в частности компоненты сети TP53. Кроме этого, сами выявленные микроРНК также могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических агентов. Использование стабильных синтетических аналогов микроРНК показало свою эффективность в ряде работ при использовании в моделях некоторых патологий *in vitro* и *in vivo*.

Проведенный анализ экспрессии малых РНК и ассоциированных с ними потенциальных генов-мишеней показал их вовлеченность в различные этапы патогенеза эндометриоза. Важно подчеркнуть, что обнаруживаемые изменения экспрессии как микроРНК, так и мРНК не всегда приводят к изменению экспрессии целевых белков. Также взаимодействие микроРНК с целевой мРНК чаще всего не приводит к ее деградации, в результате оценка изменения экспрессии мРНК транскриптов не может дать полную информацию о мишенях микроРНК, а также об изменениях активности путей внутриклеточной сигнализации, в состав которых входят данные мишени. Важно отметить, что для большинства установленных при анализе генов-мишеней нет информация об изменении экспрессии кодируемых ими белков в тканях нормального и патологического эндометрия. Таким образом, вместе с исследованием транскриптомов микроРНК и мРНК, необходимо проводить протеомное профилирование клеток и тканей, для выявления изменений белкового состава и оценки взаимосвязи между микроРНК и их белками-мишенями.

В ряде ранних работ было проведено исследование белкового состава тканей эндометрия при эндометриозе методами масс-спектрометрического анализа [275, 276, 277, 278, 279]. В частности, Rai et al. [277] сообщили о 48 белковых сигнатурах, которые дифференциально экспрессировались от II до IV стадии эндометриоза. Набор обнаруженных белков включал структурные белки, ядерные белки, клеточные шапероны, модуляторы иммунитета, белки, участвующие в энергетическом обмене, передаче сигналов, биогенезе РНК и биосинтезе белков. Фаулер и др. [278] изучали влияние эндометриоза (II стадии) на протеом эутопического эндометрия в секреторную и пролиферативную фазу цикла. Было

идентифицировано девять наиболее распространенных кандидатных белков, которые включают структурные белки, такие как виментин и актин; молекулярные шапероны, включая HSP90 и аннексин-A2; белки, участвующие в окислительно-восстановительных процессах, такие как пероксиредоксин 2; белки, участвующие в образовании/распаде белков и ДНК, включая рибонуклеозид-дифосфатредуктазу, пропицитин и пролил 4-гидроксилазу; и секреторные белки, такие как аполипопротеин А1 и гликоделин. Чжан и др. [275] также сравнили карты экспрессии белков эндометриоза и сыворотки крови женщин с эндометриозом II, III и IV стадий в секреторной фазе менструального цикла с контрольной группой. Они обнаружили ряд белков сыворотки крови изменение которых коррелировало с изменением их экспрессии в эндометрии. Среди дифференциально экспрессированных белков были выявлены белки цитоскелета, иммуномодуляторы, регуляторы клеточного цикла и сигнальной трансдукции. Эти белки включают в себя белок семейства антигенов G B1, связанный с актином белок 6, актиноподобный белок 7, ангидраза I, кислый фосфопротеин дентина I, антиген CD166, циклин A1 и белок 14-3-3. В другой работе [280] было обнаружено 119 белков, дифференциально представленных в нормальной эндометрии и эндометрии у пациенток с эндометриозом. Классификация белков в зависимости от их функции выявила несколько белков с повышенной или пониженной экспрессией, участвующих в апоптозе, иммунных реакциях, гликолитическом пути и транскрипции. Также недавно было показано снижение содержания виментина, пероксиредоксина 6 и ингибитора РНКазы/ангиогенина 1 в эндометриозе женщин с эндометриозом [276]. Мета-анализ обнаруженных дифференциально экспрессируемых белков выявил несколько представителей, изменение которых наблюдалось по крайней мере в трех из всех проведенных исследований. К ним относятся виментин, пероксиредоксины, шапероны HSP70 и HSP90, аннексины, актины и белки семейства 14-3-3, что позволяет предположить их роль в качестве патогенетических маркеров эндометриоза. Эти белки являются либо структурными белками (виментин, актины), либо белками клеточного стресса (пероксиредоксины, HSPB1, HSP70, HSP90), либо сигнальными молекулами (белки

14-3-3, аннексины). Виментин и изоформы актина персистируют и дифференцированно экспрессируются при исследовании тканей при эндометриозе [275, 277, 278, 279]. Виментин, основной компонент промежуточных филаментов, повсеместно экспрессируется в нормальных мезенхимальных клетках и, как известно, поддерживает клеточную целостность и может играть определенную роль в опухолевом росте и инвазии [281]. В последние годы виментин был признан маркером эпителиально-мезенхимального перехода, который является частью патогенеза эндометриоза [282], что позволяет рассматривать его в качестве биомаркера и терапевтической мишени. Потенциальная роль виментина в развитии эндометриоза и рака [282], обосновывает гипотезу о том, что эндометриоз и рак могут иметь много общего на молекулярном уровне [283, 284]. Эндометриальные имплантаты на брюшине обладают выживаемостью, пролиферативными, инвазивными, ангиогенными и рядом других свойств, сходных с раковыми клетками [285]. Среди белков выявленных при эндометриозе, заметное количество дифференцированно экспрессируются и функционально вовлечены в развитие различных видов рака. Среди них можно выделить матриксные металлопротеиназы [286], факторы роста, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста [287], гены, связанные с апоптозом, такие как BCL2, BAX [99], НОХ-гены [288], гликоделин [289], COX2 [290]. Окислительный стресс вовлечен в патогенез эндометриоза, и поэтому дисрегуляция пероксиредоксинов, наблюдаемая при эндометриозе, имеет огромное значение [276, 277, 278]. Белки семейства 14-3-3 — это фосфосерин или фосфотреонин связывающие белки, которые участвуют в различных клеточных процессах, включая регуляцию экспрессии генов, дифференцировку, прогрессирование клеточного цикла и метаболизма [291]. Показана их ключевая роль в развитии нескольких видов рака [292]. Было обнаружено, что различные белки 14-3-3 дифференцированно регулируются при эндометриозе [276, 277, 278], что позволяет предположить, что их дисрегуляция влияет на физиологию эндометрия и вносит свой вклад в патогенез эндометриоза. Важно отметить, что представители перечисленных выше семейств также являются

потенциальными мишенями выявленных в нашей работе дифференциально экспрессированных микроРНК.

В проведенном нами исследовании также изучалось изменение экспрессии белков при эндометриозе. Оценка состава белков проводилась в стромальных клетках эутопического эндометрия эндометриоидных кист яичников. Протеомный анализ тканей выявил интегральную экспрессию белков во всех типах клеток исследуемых образцов, что может также замаскировать специфическую экспрессию белков в определенном типе клеток. Поэтому для детализации белкового состава ткани эндометрия был проведен протеомный анализ в стромальных клетках, которые наиболее представлены в эктопическом эндометрии эндометриоидных кист яичников. По данным биоинформационного анализа было выявлено, что наиболее представлены изменения экспрессии белков, связанных с метаболизмом РНК, белков и аминокислот, а также вовлеченных в процессы миграции, апоптоза и регуляции клеточного цикла, в том числе связанные с повреждением ДНК. Для оценки взаимосвязи выявленной в стромальных клетках экспрессии микроРНК было проведено сравнение списков их генов-мишеней и дифференциально экспрессированных белков. Было установлено 18 совпадающих белков, у десяти из которых наблюдалась пониженная экспрессия при повышенной экспрессии соответствующих микроРНК, что может свидетельствовать об их возможной регуляторной роли в процессах реализуемых данными белками. Среди потенциальных мишеней микроРНК можно выделить белки, участвующие в клеточной адгезии и внутриклеточном транспорте (CDC42, NES, RDX, SDCBP) пролиферации и апоптозе (CASP3, PTMA), дифференцировке и миграции клеток (HMGB1, MTDH, PA2G4). Также возможной мишенью является продукт гена YWHAZ – представитель семейства 14-3-3, осуществляющего полифункциональную регуляцию жизненно важных клеточных процессов. Как отмечалось ранее, белки данного семейства меняют свою экспрессию при эндометриозе, что свидетельствует об их роли в патогенезе заболевания. Функциональный анализ показал группировку выявленных белков на два взаимосвязанных кластера. Первый представлен пятью белками (PTMA, HMGB1,

NES, TFRC и CASP3), принимающими участие в процессах выживания, репарации ДНК, пролиферации и воспаления. Вторая состоит из шести белков (FN1, CDC42, ARPC3, DPYSL2, RDX, YWHAZ), участвующих в адгезии, миграции, внутриклеточном транспорте и митозе. Таким образом, выявленные микроРНК и их белковые мишени могут рассматриваться как объекты для дальнейшего изучения в качестве патогенетических мишеней для терапии эндометриоза.

При помощи протеомного анализа также было показано изменение экспрессии нескольких белков в стромальных клетках эктопического эндометрия у больных с эндометриоидными кистами яичников, у которых впоследствии обнаружился рецидив заболевания. Так было показано снижение экспрессии статмина (STMN1) и белка теплового шока A2 (HSPA2, представитель семейства HSP70), а также повышение экспрессии кальпонины-1 (CNN1) и аннексина-A4 (ANXA4). Ранее было установлено, что экспрессия статмина ингибируется при злокачественных заболеваниях, таких как лейкемия, рак молочной железы и рак яичников [301]. Несмотря на свою роль в злокачественной патофизиологии, статмин также является важным белком в физиологической клеточной пролиферации. Статмин является фактором, дестабилизирующим микротрубочки, что является одним из звеньев контроля клеточной пролиферации [176]. Участвуя в клеточной пролиферации и дифференцировке, статмин входит в различные внутриклеточные сигнальные пути [177, 178].

В ряде работ было показано, что некоторые представители семейства белков теплового шока, включая HSP90 [276, 277, 278, 279] и HSP70 [277, 279], дифференциально экспрессируются при различных стадиях эндометриоза. Поскольку известно, что HSP играют ключевую роль в прогрессировании ряда видов рака человека [293], их дисрегуляция может быть вовлечена в патогенез эндометриоза. Роль HSP как молекулярных шаперонов и их взаимодействие со стероидными рецепторами [294, 295], а также вклад в пролиферацию и антиапоптоз [296] дополнительно подтверждают их роль в развитии эндометриоза.

При изучении представителей семейства аннексинов было установлено, что данные белки участвуют в клеточном цикле, клеточной пролиферации, оказывают

антиапоптотическое действие [297] и по-разному экспрессируются при эндометриозе [276, 277, 278]. Аннексины были вовлечены в патогенез ряда доброкачественных и злокачественных опухолей [298]. Дифференциальная экспрессия аннексинов на различных стадиях эндометриоза указывает на их функциональную роль в патогенезе этого заболевания.

Кальпонин 1 специфически экспрессируется в гладкомышечных клетках и играет важную роль в тонкой настройке сократительной способности гладких мышц. Помимо модуляции функции гладкомышечных миофиламентов и сократительной способности, кальпонин также регулирует актиновый цитоскелет немышечных клеток, воздействуя на многие клеточные процессы, такие как пролиферация, адгезия, миграция, дифференцировка и фагоцитоз. Кальпонин может принимать участие в метаплазии клеток эктопического эндометрия в миофибробласты, которые участвуют в процессах раневого заживления и фиброобразования тканей при заживлении. Роль кальпонины 1 при эндометриозе практически не изучена, однако его повышенная экспрессия в стромальных клетках, может быть потенциальным маркером их трансформации в миофибробласты, что может способствовать развитию эндометриоидного очага при рецидиве. Полученные нами данные и данные литературных источников указывают на то, что выявленные белки могут быть патогенетическими маркерами, оценка изменения экспрессии которых в тканях эктопического эндометрия может рассматриваться как возможный подход для прогнозирования рецидива при эндометриоидных кистах яичников.

Таким образом, последние достижения в области исследований экспрессии малых РНК при эндометриозе свидетельствуют об их существенном вкладе в регуляцию путей внутриклеточной сигнализации, задействованных в патогенезе данного заболевания. Вероятно, существуют как универсальные маркеры, общие для всех локализаций эндометриоза, так и более специфичный набор микроРНК для каждой локализации [213]. Эффективные биомаркеры не должны существенно зависеть от времени отбора проб в течение дня или фазы менструального цикла и

должны демонстрировать устойчивые паттерны экспрессии у женщин из разных этнических групп.

Необходимо отметить, что использование специфических различий в паттернах экспрессии некодирующих РНК имеет большой потенциал с точки зрения персонализированной медицины. Например, знание особенностей экспрессии микроРНК может помочь клиницистам определить наиболее эффективную индивидуальную терапию эндометриоза и, возможно, оценить вероятность рецидива заболевания. Когда терапия первой линии не эффективна, уникальный паттерн экспрессии микроРНК пациента может помочь принять решение о переходе на терапию второй линии (препараты, подавляющие эстрогеновую сигнализацию) или даже заранее предсказать, насколько эффективной может быть та или иная терапия [299]. Сигнатуры микроРНК потенциально могут помочь ранней идентификации таких пациенток и скорректировать терапию.

В этой связи, клинические исследования, отслеживающие экспрессию специфических маркеров у отдельных пациенток с течением времени и в зависимости от применяемого лечения, еще больше прояснят, какие микроРНК лучше всего соответствуют степени заболевания и четко коррелируют с терапевтическим ответом и/или рецидивом. Мониторинг экспрессии характерных для эндометриоза микроРНК может также позволить оценить эффективность применяемой терапии. Клиническая диагностика эндометриоза часто откладывается на многие годы после появления первых симптомов, что приводит к длительному отсутствию лечения и прогрессированию заболевания. Возможность малоинвазивного определения экспрессии микроРНК в эндометрии может оказаться эффективной в качестве дополнительного инструмента для ранней диагностики эндометриоза и его рецидивов. В пользу этого указывают полученные нами данные о повышенной экспрессии ряда микроРНК в эндометрии у больных эндометриозом. Важно отметить, что выявленное повышение экспрессии не зависело от фазы

менструального цикла, что является положительным фактором для выбора потенциального диагностического маркера.

Сочетание анализа экспрессии микроРНК и белков, функциональных исследований выявленных маркеров *in vitro*, биоинформатического прогнозирования потенциальных мишеней совместно с клиническими данными является перспективным направлением и требует дальнейшего развития для внедрения новых способов диагностики и терапии эндометриоза.

В целом, на основе полученных результатов проведенной работы сформирован существенный задел для дальнейших исследований и детализации механизмов патогенеза эндометриоза. Полученные данные дали ценную информацию о путях внутриклеточной сигнализации и их компонентах, которые могут рассматриваться в качестве патогенетических маркеров и потенциальных терапевтических мишеней для лечения эндометриоза и его осложнений.

Выводы

1. К факторам риска развития наружного генитального эндометриоза у женщин репродуктивного возраста относится наличие преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе, а также отягощенный семейный анамнез у 25% пациенток с эндометриоидными кистами яичников и 44% с ретроцервикальным эндометриозом. Для женщин с эндометриоидными кистами яичников и с ретроцервикальным эндометриозом характерны различия в клинической картине, тяжести течения заболевания и хирургическом лечении. Наиболее частые жалобы пациенток с различными формами наружного генитального эндометриоза – боли внизу живота, болезненные менструации, диспареуния – схожи, но наиболее выражены при ретроцервикальном эндометриозе.

2. У пациенток с эндометриоидными кистами яичников частота первичного бесплодия достигает 51%, что значительно выше по сравнению с женщинами с ретроцервикальным эндометриозом – 22%. Частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, достоверно выше среди женщин, которые были прооперированы по поводу ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31.

3. Показано изменение экспрессии микроРНК в эктопическом и эндометриальном эндометрии при эндометриоидных кистах яичников и ретроцервикальном эндометриозе в зависимости от локализации очага и фазы менструального цикла.

4. Выявлена повышенная экспрессия трех микроРНК: miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p в эндометрии больных эндометриозом, которые в перспективе могут быть использованы в качестве диагностических маркеров наружного генитального эндометриоза.

5. В стромальных клетках эктопического эндометрия пациенток с рецидивом эндометриоидных кист яичников выявлены белки: статмин-1, белок теплового

шока А2, кальпонин-1 и аннексин-А4, которые могут рассматриваться в качестве потенциальных прогностических маркеров рецидивирования эндометриоза.

6. Впервые показана экспрессия пивиРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия. Биоинформационный анализ путей внутриклеточной сигнализации, регулируемых пивиРНК, указывает на то, что изменение их экспрессии может служить новым патогенетическим звеном при развитии эндометриоза.

Практические рекомендации

1. Пациенток с отягощенным семейным анамнезом по эндометриозу, а также с наличием воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе следует относить в группу риска по развитию наружного генитального эндометриоза. Это позволит повысить эффективность профилактики, динамического наблюдения, диспансеризации с целью выявления эндометриоза до клинической манифестации и реализации репродуктивной функции с учетом высокого риска развития заболевания.

2. Исследование соскоба эндометрия для выявления микроРНК-106b-5p, -1-3p и -143-3p с помощью ПЦР в режиме реального времени целесообразно для неинвазивной диагностики эндометриоза на доклиническом этапе.

3. При хирургическом лечении эндометриоза пациенткам может быть рекомендовано проведение протеомного исследования тканей эктопического эндометрия для выявления белков-маркеров с целью прогнозирования риска рецидивирования, что позволит определить тактику ведения пациенток после операции и рекомендовать сроки реализации репродуктивной функции.

4. Внедрение нового алгоритма диагностики эндометриоза позволит выявить заболевание на ранней стадии, своевременно назначить лечение, и предотвратить возникновение рецидивов.

Список сокращений

- аГнРГ – агонисты гонадотропин-рилизинг гормона
- ВАШ – визуальная аналоговая шкала
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ДЭМ, дэ-микроРНК – дифференциально экспрессирующиеся микроРНК
- ИЛ/IL – интерлейкин
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КОК – комбинированные оральные контрацептивы
- мкРНК – микроРНК
- МРТ – магнитно – резонансная томография
- НГЭ – наружный генитальный эндометриоз
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РЦЭ – ретроцервикальный эндометриоз
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
- ЭКЯ – эндометриоидные кисты яичников
- ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация
- АКТ – внутриклеточный фермент, один из трёх членов семейства протеинкиназ В.
- ВАХ – BCL-2-ассоциированный X-белок
- BCL2 – белок B-cell lymphoma 2
- CCN – белок из семейства циклинов, специфически регулирующий фазовый переход G1 / S-фаза в клеточном цикле
- CDC – циклин зависимые фосфатазы
- CDH1 – эпителиальный кадгерин, ген – супрессор опухолей
- Ec – эктопический эндометрий
- EFI – индекс фертильности при эндометриозе (Endometriosis fertility index)
- Eu – аутопический эндометрий
- FZD7 – Члены семейства «смятых» генов кодируют белки 7-трансмембранного домена, которые являются рецепторами для сигнальных белков Wnt.
- JAK/STAT – тирозинкиназа/сигнал-преобразователя и активатора транскрипции
- KIT
- HSP – белок теплового шока
- ICAM – интегральный мембранный белок
- LEF1 – лимфоцит связывающий фактор 1 (Lymphoid enhancer-binding factor-1)
- MMP – матриксная металлопротеиназа
- MYB – семейство генов из факторов транскрипции

NGS – секвенирование (next generation sequencing)

Norm – нормальный эндометрий

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

NTRK2 – нейротрофический рецептор тирозинкиназы 2

PCR – ПЦР в реальном времени

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PLK1 – серин/треонин протеинкиназа 1

TP53 – транскрипционный фактор p53

VEGF – (vascular endothelial growth factor) сосудистый эндотелиальный фактор роста

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

Список литературы

1. Адамян, Л.В. Клиника, диагностика и лечение генитального эндометриоза / Л.В. Адамян // *Акушерство и гинекология*. – 1992. – № 7. – С. 54-59.
2. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация / Л.В. Адамян [и др.]. – М., 2013. – 65 с.
3. Rogers P.A., Adamson D.G. et al. Research Priorities for Endometriosis: Recommendations from a Global Consortium of Investigators in Endometriosis. *Reprod Sci*. 2017; 24(2):202–226.
4. Davis A.C., Goldberg J.M. Extrapelvic endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2017; 35 (1): 98 – 101.
5. Андреева Е.Н. Распространенные формы генитального эндометриоза: медико-генетические аспекты, диагностика, клиника, лечение и мониторинг больных: дис. д-ра мед. наук / Е.Н. Андреева — М, 1997. – 333 с.
6. Hsiao K., Wu M., Tsai S. Epigenetic regulation of the pathological process in endometriosis. *Reprod. Med. Biol*. 2017; 16:314–319.
7. Nisenblat V., Bossuyt P.M., Shaikh R., et al. Blood biomarkers for the noninvasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;5:CD012179.
8. Адамян Л.В. Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков. – М., 2006. – С. 216.
9. Адамян Л.В. Роль современной гормонотерапии в комплексном лечении генитального эндометриоза / Л.В. Адамян, Е.Н. Андреева // *Проблемы репродукции*. – 2011. – № 6. – С. 66-77.
10. Адамян Л.В. Клинический профиль российских пациенток с диагнозом «генитальный эндометриоз», получающих лечение агонистом гонадотропинового релизинг гормона. Результаты российского открытого многоцентрового исследования / Л.В. Адамян, Е.Н. Андреева, Е.Л. Яроцкая // *Проблемы репродукции*. - 2011. - № 2.- С. 50–62.

11. Fassbender A., Vodolazkaia A., Saunders P., Lebovic D., Waelkens E., De Moor B. et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril*. 2013; 99:1135–45.
12. Soysal S., Soysal M.E., Ozer S., Gul N., Gezgin T. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2004; 19 (1):160 – 167.
13. Vercellini P., Somigliana E., Viganò P., De Matteis S., Barbara G., Fedele L. Postoperative endometriosis recurrence: a plea for prevention based on pathogenetic, epidemiological and clinical evidence. *Reprod. Biomed. Online*. 2018; 21(2): 259–65.
14. Адамян Л.В. Современный взгляд на проблему эндометриоза / Л.В. Адамян, Е.Л. Яроцкая, В.Д. Чупрынин // *Качество жизни. Медицина. Болезни органов репродуктивной системы*. – 2004. – Т. 3, № 6. – С. 21-27.
15. Giudice L.C. Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2006. 4 (Suppl 1): S4.
16. Адамян Л.В. Генитальный эндометриоз: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение: методическое пособие для врачей / Л.В. Адамян, Е.Н. Андреева. – М., 2001. – С. 27.
17. Dunselman G.A.J., Vermeulen N., Becker C., Hooghe T.D., De Bie V., Heikinheimo O. et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014; 29:400–12.
18. Fassbender A., et al. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis [Electronic resource] // *Biomed. Res. Int*. 2015.
19. Адамян Л.В. Эндометриозы / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков. – М.: Медицина, 1998. – 317 с.
20. Бурлев В.А. Ангиогенез в развитии перитонеального эндометриоза (обзор литературы) / В.А. Бурлев, С.В. Павлович // *Проблемы репродукции*. - 2003.- No2. – С. 42-47.
21. Parazzini F. et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2017. – Т. 209. – С. 3-7.

22. Кира Е.Ф., Цвелев Ю.В. Эндометриозная болезнь //Гинекология: руководство для врачей/Под ред. В.Н Серова и Е.Ф Кира. М.: Литера. – 2008., Литера. Москва.
23. Ищенко А.И, Кудрина Е.А. Эндометриоз: современные аспекты патогенеза, диагностики и лечения. 2003; 2: 68-75.
24. Ищенко, А.И. Патогенез, клиника и оперативное лечение распространенных форм генитального эндометриоза: автореф. дис. д-ра мед. наук / А.И. Ищенко. – М., 1993. – 44 с.
25. Sanfilippo, J. S. Endometriosis: pathophysiology / J.S. Sanfilippo // Intern. Congress of Gynecol. Endoscopy. AAGL, 23-rd Annual Meeting. – NY, 1994. - P. 115-130.
26. Адамян Л.В. Генитальный эндометриоз. Современный взгляд на проблему / Л.В. Адамян, С.А. Гаспарян. – Ставрополь, 2004. – 228 с.
27. Batt R.E. Emergence of endometriosis in North America: a study in the history of ideas. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Buffalo / R. E. Batt. – State University of NY, 2008. – P. 109-113.
28. Cullen T.S. The distribution of adenomyoma containing uterine mucosa / T.S. Cullen // Arch. Surg. – 1921. – Vol. 1. – P. 215-283.
29. Leyland N., Casper R., Laberge P. et al. Endometriosis: diagnosis and management // J. Obstet. Gynecology Can. 2010. Vol. 32. № 7. Suppl. 2. P. S1–32.
30. Practice bulletin no. 114: management of endometriosis // Obstet. Gynecol. 2010. Vol. 116. № 1. P. 223–236.
31. Parente Barbosa C., Bentes De Souza A., Bianco B., Christofolini D. Effect of Hormones on Endometriosis Development. Minerva Ginecol. -2011Aug. 63(4). -375-86.
32. Abbas S. J. Prevalence and Incidence of Diagnosed Endometriosis and Risk of Endometriosis in Patients with Endometriosis-Related Symptoms: Findings from a Statutory Health Insurance-Based Cohort in Germany. Obstet Gynecol Reprod Biol. 2012 Jan;160(1):79-83.
33. Дамиров М.М. Генитальный эндометриоз болезнь активных и деловых женщин -М., Изд-во БИНОМ - 2010. - 191с.

34. Yang Y. et al. Adolescent endometriosis in China: a retrospective analysis of 63 cases //Journal of pediatric and adolescent gynecology. – 2012. – T. 25. – №. 5. – C. 295-299.
35. Dowlut-McElroy T., Strickland J.L. Endometriosis in adolescents //Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. – 2017. – T. 29. – №. 5. – C. 306-309.
36. Gordts S., Koninckx P., Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis //Fertility and sterility. – 2017. – T. 108. – №. 6. – C. 872-885. e1.
37. Koninckx P.R. et al. Epidemiology of subtle, typical, cystic, and deep endometriosis: a systematic review //Gynecological Surgery. – 2016. – T. 13. – №. 4. – C. 457-467.
38. Lee D. Y. et al. Clinical characteristics of adolescent endometrioma //Journal of pediatric and adolescent gynecology. – 2013. – T. 26. – №. 2. – C. 117-119.
39. Geysenbergh B., Dancet E. A. F., D’Hooghe T. Detecting endometriosis in adolescents: why not start from self-report screening questionnaires for adult women? //Gynecologic and obstetric investigation. – 2017. – T. 82. – №. 4. – C. 322-328.
40. Garcia, L., Isaacson, K. «Adenomyosis: review of the literature». J. Minim Invasive Gynecol 18 (2011): 428–437.
41. Role of microRNAs in gynecological pathology / J. Gilabert-Estelles [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2012. – Vol. 19. – P. 2406–2413.
42. Ibrahim S.A. MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior / S.A. Ibrahim, H. Hassan, M. Götte // Biochim. Biophys. Acta, - 2014. – Vol. 1840. – P. 2609-2620.
43. S. Griffiths-Jones et al. MiRBase: tools for microRNA genomics // Nucleic Acids Research. - 2008. - Vol. 36. - P. 154- 158.
44. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature – 2004. 431:350 – 55.
45. Ebert M.S, Sharp P.A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. Cell – 2012. 149:515–24
46. Liu C., Kelnar K., Vlassov A.V., Brown D., Wang J., Tang D.G. Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem progenitor cells and tumor-suppressive functions of let 7. Cancer Res. 2012; 72 (12): 3393–3404.

47. Friedlander M. R. et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs // *Genome Biology*. - 2014. - Vol. 15, No 4.-P. 57.
48. Lim L.P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature*. - 2005. - Vol. 433, No 7027.- P. 769- 773.
49. Yang, L. Small RNA molecules in endometriosis: pathogenesis and therapeutic aspect / L. Yang, H.Y. Liu // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2014. – Vol. 183. - P. 83-88.
50. Mari- Alexandre J. et al. MiRNAs regulation and its role as biomarkers in endometriosis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17 (1).
51. Adammek M. et al. MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99.–P.1346–1355.
52. Kachgal S. The dual roles of homeobox genes in vascularization and wound healing / S. Kachgal, K.A. Mace, N.J. Boudreau // *Cell Adhes. Migr.* – 2012. – Vol. 6. - P. 457-470.
53. Dai L. DiMiR-199a attenuates endometrial stromal cell invasiveness through suppression of the IKK β /NF- κ B pathway and reduced interleukin-8 expression / L. Dai, L. Gu, W. Di // *Mol. Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 18. – P. 136- 145.
54. Liu S. et al. Expression of miR-126 and Crk in endometriosis: miR-126 may affect the progression of endometriosis by regulating Crk expression // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2012. – Vol. 285. - P. 1065-1072.
55. Shen L. et al. MicroRNA23a and MicroRNA23b Deregulation Derepresses SF-1 and Upregulates Estrogen Signaling in Ovarian Endometriosis // *Gynecol. Obstet.* – 2013. – Vol. 98. – P. 1575-1582.
56. Long M. et al. CaimiR-29c is downregulated in the ectopic endometrium and exerts its effects on endometrial cell proliferation, apoptosis and invasion by targeting c-Jun // *Int. J. Mol. Med.* – 2015. – Vol. 35. - P. 1119-1125.
57. Zhang D. et al. MiR-202 promotes endometriosis by regulating SOX6 expression // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 8. – P. 17757-17764.

58. Yang Y.M. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis [Electronic resource] // *Oncotarget*. – 2017.
59. Zheng B. et al. The differential expression of microRNA-143,145 in endometriosis // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2014. – Vol. 12. – P. 555-560.
60. Rogers P. et al. Defining future directions for endometriosis research: workshop report from the 2011 World Congress of Endometriosis in Montpellier, France // *Reprod. Sci.* – 2013. – Vol. 20 (5). - P. 483–499.
61. Gregory P.A. et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition // *Mol. Biol. Cell.* – 2011. – Vol. 22. – P. 1686-1698.
62. Kent O.A. et al. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. - P. 7528-7538.
63. Адамян Л. В. Состояние репродуктивной системы у больных доброкачественными опухолями внутренних гениталий и принципы восстановительного лечения // Москва. – 1985. Москва.
64. Nichols D.H., Clarke-Pearson D.L. *Gynecologic, Obstetric, & Related Surgery*. – Mosby, 1999.
65. Adamson G.D. Endometriosis Fertility Index: is it better than the present staging systems? *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*. 2013;25(3):186-92.
66. Баскаков В.П. Поражение органов мочевой системы при генитальном эндометриозе / В.П. Баскаков, Ю.В. Цвелев, А.А. Семенюк // В кн.: Актуальные вопросы гинекологии. - М.: ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2000. – С. 37 - 45.
67. Гаврилова Т.Ю. Состояние локального и системного ангиогенеза у больных с эндометриозом / Т.Ю. Гаврилова, Л.В. Адамян // *Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний*. - М; 2006. - С. 102-103.
68. Ищенко А.И. Эндометриоз: диагностика и лечение / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 104 с.

69. Яроцкая Е.Л. Современные подходы к лечению больных с тазовыми болями в клинике оперативной гинекологии: дис. д-ра мед. наук / Е.Л. Яроцкая. – М., 2004. – 379 с.
70. Stratton P. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications / P. Stratton, K.J Berkley // Hum Reprod Update. - 2011. - Vol. 17. - No 3. - P. 327–346.
71. Павлов Р.В. Прогнозирование рецидивов наружного генитального эндометриоза / Р.В. Павлов, М.С. Кундохова // Астраханский медицинский журнал. – 2011. -№ 6 (3). – С. 119-122.
72. Демидов В.Н. и др. Эхография органов малого таза у женщин. Эндометриоз: практическое пособие – М.: Инф. "Скрипто", 1997. – Вып. 1. – 60 с.
73. Кулаков В.И. Магнитно-резонансная томография в гинекологии / В.И. Кулаков, Л.В. Адамян, К.Д. Мурватов // Атлас. – М.: Антидор, 1999.
74. Рухляда Н.Н. Диагностика и лечение манифестного эндометриоза / Н.Н. Рухляда / Под ред. Ю.В. Цвелева. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2004. –С. 205.
75. Пересада О.А. Эндометриоз: диагностические, клинические, онкологические и лечебные аспекты / О.А. Пересада // Медицинские новости. – 2009. – № 14 – С. 15-26.
76. Адамян Л. В. Эндометриозы: Руководство для врачей / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков, Е.Н. Андреева. — М.: Медицина, 2006. - Изд. 2-е, перераб. и доп. – 416 с.
77. Мельников М.В. Диагностика и тактика хирургического лечения инфильтративного эндометриоза у пациенток репродуктивного возраста / М.В. Мельников, В.Д. Чупрынин. // Акушерство и гинекология. -2012. -№ 7. С.42 - 49.
78. Хашукоева А.З. Нестероидные противовоспалительные средства в лечении первичной дисменореи / А.З. Хашукоева, С.А. Хлынова, М.В. Бурденко // Лечащий врач. - 2014. - No 3. - С. 29-32.
79. Кондратьева П.Г. Роль ангиогенных и провоспалительных факторов в развитии наружного генитального эндометриоза: дис. канд. мед. наук / П.Г. Кондратьева. - СПб., 2010.

80. Хашукоева А.З. Эндоскопические методы визуализации в комплексной диагностике синдрома хронических тазовых болей у женщин / А.З. Хашукоева, А.В. Макаров, А.В. Зайцев // Лечащий врач. – 2011. – No 11. – С. 36-37.

81. Савилова А.М. и др. Характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из очагов эндометриоза человека и из эндометрия // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. - No2. – С. 132-136.

82. Сонова М.М. Клинико-морфологические, молекулярно-биологические и лечебные факторы генитального эндометриоза: автореф. дисс. д-ра мед. наук / М.М. Сонова. – М., 2009. – 52 с.

83. Адамян Л.В. Опыт применения гестринона в комбинированном лечении распространенных форм эндометриоза // Гестринон. Гормональная терапия эндометриоза. — М, 1993. -С. 19-30.

84. Манухин И.Б. и др. Комплексное лечение синдрома тазовых болей при наружном эндометриозе // Междунар. конгресс по эндометриозу с курсом эндоскопии. - М., 1996. – 420 с.

85. Ищенко А.И. Эндометриоз: современные аспекты / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина. - М.: МИА, 2008. – 176 с.

86. Краснопольский В.И. Врачебная тактика при распространенных формах генитального эндометриоза / В.И. Краснопольский, А.И. Ищенко // Акушерство и гинекология. – 1997. – No 5. – С. 16-18.

87. Стрижаков А.Н. Эндометриоз: спорное и нерешенное / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов // Врач. – 2006. – No 9. – С. 5-9.

88. Адамян Л.В. и др. Новые патогенетические аспекты распространенного инфильтративного эндометриоза: теории и практика // Проблемы репродукции. – 2010. – No 4. – С. 31-36.

89. Адамян Л.В. Генитальный эндометриоз: дискуссионные вопросы и альтернативные подходы к диагностике и лечению / Л.В. Адамян, Е.Л. Яроцкая // Журнал акушерства и женских болезней. – 2002. – No 3. – С. 103- 111.

90. Баскаков В.П. Эндометриозная болезнь / В.П. Баскаков, Ю.В. Цвелев, Е.Ф. Кира - СПб.: Издательство Н - Л, 2002. - 452с.

91. Доброхотова Ю.Э. Диагностические и лечебные аспекты при эндометриозе у пациенток с хронической тазовой болью / Ю.Э. Доброхотова, А.А. Грудкин // Лечебное дело. - 2012. - No 2. - С.75-80.

92. Геворкян М.А. и др. Профилактика рецидива наружного генитального эндометриоза // Проблемы репродукции. - 2008. - No1. - С. 78-80.

93. Jones K.D. Recurrence of chocolate cysts after laparoscopic ablation / K.D. Jones, C.J. Sutton // J Am Assoc Gynecol Laparosc. - 2002. - Vol.9. - No 3. - P. 315-320.

94. Koga K. et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision // Hum. Reprod. - 2006. - Vol. 21. - No 8. – P. 2171-2174.

95. Ярмолинская М.И. Опыт применения диеногеста в комбинированном лечении генитального эндометриоза / М.И. Ярмолинская, В.Ф. Беженарь // Фарматека. Акушерство и Гинекология. Уронефрология. – 2013. – No 3. – С. 48-51.

96. Namnoum A.B. et al. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis // Fertil Steril. - 1995. – Vol. 64. - No 5. - P. 898-902.

97. Johnson N.P. World Endometriosis Society Montpellier Consortium. Consensus on current management of endometriosis / N.P. Johnson, L. Hummelshoj // Hum. Reprod. - 2013. – Vol. 28. - No 6. - P. 1552-1568.

98. Busacca M. et al. Determinants of long-term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis // Am J Obstet Gynecol. - 2006. - Vol. 195. - P. 426-432.

99. Busacca M. et al. Surgical treatment of recurrent endometriosis: laparotomy versus laparoscopy // Hum. Reprod. - 1998. – Vol. 13. – P. 2271-4.

100. F. Shen et al. Immunoreactivity of progesterone receptor isoform B and nuclear factor kappa-B as biomarkers for recurrence of ovarian endometriomas // Am J Obstet Gynecol. - 2008. – Vol. 199. -No 5. – P. 486-496.

101. Guo S.W. Recurrence of endometriosis and its control / S.W. Guo // Hum. Reprod. - 2009. –Vol. 15. - No 4. – P. 441-461.

102. Fedele L. et al. Laparoscopic excision of recurrent endometriomas: long-term outcome and comparison with primary surgery // *Fertil. Steril.* - 2006. – Vol. 85. - No 3. –P. 694-699.

103. Exacoustos C. et al. Recurrence of endometriomas after laparoscopic removal: sonographic and clinical follow-up and indication for second surgery // *J Minim Invasive Gynecol.* - 2006. – Vol. 13. - No 4. – P. 281-288.

104. Угаров, Г.С. О роли воды и липидов в организации живой материи / Г.С. Угаров // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* - 2015. - No 5. - С. 443-447.

105. Ярмолинская, М.И. Цитокиновый профиль перитонеальной жидкости и периферической крови больных с наружным генитальным эндометриозом / М.И. Ярмолинская // *Журнал акушерства и женских болезней.* – 2008. – Т. 57, No 3. – С. 30-34.

106. Saleh A. Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by excision and by fenestration / A. Saleh, T. Tulandi // *Fertil Steril.* - 1999. -Vol. 72. - No 2. – P. 322-324.

107. Гаспарян С.А. Инфильтративная форма генитального эндометриоза: патогенез, диагностика, лечение, методы реабилитации, отдаленные результаты: дис. д-ра мед. наук / С.А. Гаспарян - М., 2003. - 321 с.

108. Доброхотова Ю.Э. и др. Опыт применения Визанны у пациенток с диагностированным эндометриозом // *Проблемы репродукции.* - 2014.- No3. - С.33-35.

109. Singh S. S., Suen M. W. H. Surgery for endometriosis: beyond medical therapies // *Fertility and sterility.* – 2017. – Т. 107. – №. 3. – С. 549-554.

110. Römer T. Long-term treatment of endometriosis with dienogest: retrospective analysis of efficacy and safety in clinical practice // *Archives of gynecology and obstetrics.* – 2018. – Т. 298. – №. 4. – С. 747-753.

111. Lee J. H. et al. Effectiveness of dienogest for treatment of recurrent endometriosis: multicenter data // *Reproductive Sciences.* – 2018. – Т. 25. – №. 10. – С. 1515-1522.

112. Bedaiwy M. A., Allaire C., Alfaraj S. Long-term medical management of endometriosis with dienogest and with a gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back hormone therapy //Fertility and sterility. – 2017. – T. 107. – №. 3. – C. 537-548.
113. de Paula Andres M. et al. Dienogest in the treatment of endometriosis: systematic review //Archives of gynecology and obstetrics. – 2015. – T. 292. – №. 3. – C. 523-529.
114. Brown J., Kives S., Akhtar M. Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2012. – №. 3.
115. Momoeda M. A randomized, double-blind, multicenter, parallel, dose-response study of dienogest in patients with endometriosis //Jpn Pharmacol Ther. – 2007. – T. 35. – C. 769-783.
116. Osuga Y., Fujimoto-Okabe H., Hagino A. Evaluation of the efficacy and safety of dienogest in the treatment of painful symptoms in patients with adenomyosis: a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled study //Fertility and sterility. – 201. – T. 35. – C. 769-783.
117. Crosignani P. G. et al. Subcutaneous depot medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain //Human Reproduction. – 2006. – T. 21. – №. 1. – C. 248-256.
118. Dunselman G. A. J. et al. “ESHRE guideline: management of women with endometriosis”. Human Reproduction, vol. 29, no. 3, pp. 400–412, Mar. 2014
119. «ACOG Committee Opinion No. 760: Dysmenorrhea and Endometriosis in the Adolescent». Obstetrics & Gynecology, vol. 132, no. 6, pp. 249–258, Dec. 2018.
120. Vilasagar S., Bougie O., and Singh S. S. «A Practical Guide to the Clinical Evaluation of Endometriosis-Associated Pelvic Pain». Journal of Minimally Invasive Gynecology, Oct. 2019.
121. Flyckt R., Kim S., and Falcone T. «Surgical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain». Seminars in Reproductive Medicine, vol. 35, no. 01, pp. 054–064, Jan. 2017.

122. Scheppe K. W. «The Current Place of Progestins in the Treatment of Endometriosis». *Expert Rev of Obstet Gynecol.*, vol. 7, no. 2, pp. 141–148, Jan. 2012.

123. Cucinella G. et al. «Oral contraceptives in the prevention of endometrioma recurrence: does the different progestins used make a difference?». *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 288, no. 4, pp. 821–827, Oct. 2013.

124. Brown J., Crawford T. J., Datta S., and Prentice A. «Oral contraceptives for pain associated with endometriosis». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, May 2018.

125. Brown J., Pan A., and Hart R. J. «Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Dec. 2010.

126. Farmer J.E. et al. «Gonadotrophin-releasing hormone analogues for endometriosis: bone mineral density». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Oct. 2003.

127. Попов А.А. и др. Медикаментозная терапия в лечении эндометриоза // РМЖ. «Акушерство. Гинекология. Педиатрия». – 2014. – No 14. – С. 1010- 1013.

128. Тихомиров А.Л. Патогенетическое обоснование применения агонистов ГнРГ в терапии сочетанной гинекологической патологии / Тихомиров А.Л., Лубнин Д.М // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2006. - Т. 5, No 1. -С. 82-87.

129. Марченко Л.А. Современный взгляд на отдельные аспекты эндометриоза / Марченко Л.А., Ильина Л.М. // Проблемы репродукции. – 2001. – No 1. – С. 61-66.

130. Подзолкова Н.М. Наружный генитальный эндометриоз: взгляд репродуктолога / Н.М. Подзолкова, Ю.А. Колода, В.В. Коренная // Фарматека. - 2012. - No 12. - С. 64-71.

131. Abae M. et al. Immunoreactive endothelin-1 concentrations in follicular-fluid of women with and without endometriosis undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer // *Fertility and sterility*. - 1994. – Vol. 61. - No 6. – P. 1083-1087.

132. Nnoaham K.E. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries / Nnoaham K.E., Hummelshoj L., Webster P // *Fertility and Sterility*. - 2011. - Vol. 96. - No 2. - P. 366–373.

133. Trelle S. et al. «Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis», *BMJ*, vol. 342, no. jan11 1, pp. c7086–c7086, Jan. 2011.

134. Ferrero S., Evangelisti G., and Barra F. «Current and emerging treatment options for endometriosis», *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 19, no. 10, pp. 1109–1125, Jul. 2018.

135. DiVasta A.D. et al. «Hormonal Add-Back Therapy for Females Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist for Endometriosis», *Obstetrics and Gynecology*, vol. 126, no. 3, pp. 617–627, Sep. 2015.

136. Johnson N.P. et al. «Consensus on current management of endometriosis», *Human Reproduction*, vol. 28, no. 6, pp. 1552–1568, Jun. 2013.

137. Abou-Setta A.M., Al-Inany H.G., Farquhar C. «Levonorgestrel-releasing intrauterine device (LNG-IUD) for symptomatic endometriosis following surgery», in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, A. M. Abou-Setta, Ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

138. Petta C. A. et al. «Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis», *Human Reproduction*, vol. 20, no. 7, pp. 1993–1998, Jul. 2005

139. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(2):121 – 55.

140. May K.E. et al. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review // *Hum Reprod Update*. - 2010. – Vol. 16. - No 6. – P. 651-674.

141. Riazi H. et al. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review // *BMC Women's Health*. - 2015. – Vol. 5. - No 39. - P. 15-39.

142. Vicente-Muñoz S., Morcillo I., Puchades-Carrasco L., Payá V., Pellicer A., Pineda-Lucena A. Pathophysiologic processes have an impact on the plasma metabolomic signature of endometriosis patients. *Fertil Steril*.2016;106:7:1733-1741.

143. Vicente-Muñoz S., Morcillo I., Puchades-Carrasco L., Payá V., Pellicer A., Pineda-Lucena A. Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 2015; 104:5:1202-1209
144. Vodolazkaia A., El-Aalamat Y., Popovic D., Mihalyi A., Bossuyt X., Kyama C.M., Fassbender A., Bokor A., Schols D., Huskens D., Meuleman C., Peeraer K., Tomassetti C., Gevaert O., Waelkens E., Kasran A., De Moor B., D'Hooghe T.M. Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Human Reproduction*. 2012;27(9):2698-2711.
145. Kyama C.M., Mihalyi A., Gevaert O., Waelkens E., Simsa P., Van de Plas R. et al. Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95:1338–43
146. Taylor R.N., Lebovic D.I., Mueller M.D. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 2002; 955:89–100; discussion 118, 396–406.
147. Becker C.M., D'Amato R.J. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. *Microvasc Res* 2007; 74:121–30.
148. Matalliotakis I.M., Goumenou A.G., Koumantakis G.E., Athanassakis I., Dionyssopoulou E., Neonaki M.A. et al. Expression of serum human leukocyte antigen and growth factor levels in a Greek family with familial endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10:118–21.
149. Xavier P., Belo L., Beires J., Rebelo I., Martinez-de-Oliveira J., Lunet N. et al. Serum levels of VEGF and TNF-alpha and their association with C-reactive protein in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2006;273: 227–31.
150. Bourlev V., Iljasova N., Adamyan L., Larsson A., Olovsson M. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 94:52–7.
151. Bjorkman S., Taylor H. S. microRNAs in endometriosis: Biological function and emerging biomarker candidates. *Biology of Reproduction*.2019.

152. Flores D.F. et al. Noninvasive diagnosis of endometriosis: Review of current peripheral blood and endometrial biomarkers // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2018. – Vol. 50. - 72-83.

153. Gupta D. et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis [Electronic resource] // Cochrane Database Syst. Rev. -2016. - No4. - CD012165.

154. Zhu H. et al. MicroRNA-488 inhibits endometrial glandular epithelial cell proliferation, migration, and invasion in endometriosis mice via Wnt by inhibiting FZD7 [Electronic resource] // J. Cell Mol. Med. – 2019. - Feb 7.

155. Nisenblat V. et al. Plasma microRNAs display limited potential as diagnostic tools for endometriosis [Electronic recourse] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2019. - Jan 3.

156. Hu Z., Mamillapalli R., Taylor H.S. Increased circulating miR-370-3p regulates Steroidogenic Factor 1 in Endometriosis [Electronic resource] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2018. - Dec 21.

157. Garzon R., Calin G.A., Croce C.M. MicroRNAs in cancer. Annu rev med. 2009; 60:167–79.

158. Gangaraju V.K., Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. Nat. rev. mol. cell biol. 2009; 10:116–25.

159. Wang Y., Stricker H.M., Gou D., Liu L. MicroRNA: past and present. Front biosci. 2007; 12:2316–29.

160. Wang J., Chen J., Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. Journal of Cellular Physiology 2016; 231:25-30.

161. The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012; 489:57–74.

162. Филиппова Е.С., Межлумова Н.А., Гамисония А.М., Эльдаров Ч.М., Кузнецова М., Трофимов Д.Ю., Павлович С.В., Казаченко И.Ф., Бобров М.Ю., Адамян Л.В. Профилирование микроРНК и мРНК в тканях эутопического и эктопического эндометрия при эндометриодинах кистах яичников. // Проблемы репродукции. 2019;25(2): 27-45.

163. Knauss J.L., Sun T. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs in vertebrate central nervous system development and function. *Neuroscience*. 2013; 235:200–214.
164. Chan J.J., Tay Y. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (5): 1310.
165. Hashim A., Rizzo F., Marchese G., Ravo M., Tarallo R., Nassa G., Giurato G., Santamaria G., Cordella A., Cantarella C., Weisz A. RNA sequencing identifies specific PIWI-interacting small non-coding RNA expression patterns in breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5(20):9901–9910.
166. Siomi M.C., Sato K., Pezic D., Aravin A.A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence.. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011; 12 (4): 246-258.
167. Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*. 2009;457(7228):413–20.
168. Sai Lakshmi S., Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36 (1): D173–D177.
169. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (D1) D68–D73.
170. Huang X.A., Yin H., Sweeney S., Raha D., Snyder M., H. Lin. A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Developmental cell*. 2013;24(5):502–516.
171. Aravin A.A., Sachidanandam R., Girard A., Fejes-Toth K., Hannon G.J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*. 2007; 316 (5825): 744–747.
172. Burney R.O., Hamilton A.E., Aghajanova L., Vo KC, Nezhat C.N., Lessey B.A., Giudice L.C. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. 2009; 15:625-631.

173. Seppala M.K.H., Koistinen R., Hautala L., Chiu P.C., Yeung W.S. Glycodelin in reproductive endocrinology and hormone-related cancer. *European Journal of Endocrinology*. 2009;160(2):121-133.
174. Matalliotakis M. The role of gene polymorphisms in endometriosis. 2017; 16(5): 5881–5886.
175. Jia S.Z., Yang Y., Lang J., Sun P., Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are downregulated in women with endometriosis. *Human Reproduction*. 2013;28(2):322-330.
176. Marklund U., N Larsson, H M Gradin, G Brattsand, M Gullberg Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics *EMBO J*. 1996 Oct 1;15(19):5290-8.
177. Sobel A., Bouterin M.C., Beretta L., Chneiweiss H., Doye V., Peyro-Saint-Paul H. Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem*. 1989 Mar 5;264(7):3765-72.
178. Rubin C.I., Atweh G.F. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 1;93(2):242-50.
179. Wertel I., Barczyński B., Kwaśniewski W., Bednarek W., Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;168(2):187-190.
180. Yun B.H., Lee Y.S., Chon S.J., Jung Y.S., Yim S.Y., Kim H.Y., Park J.H., Seo S.K., Cho S., Choi Y.S., Lee B.S. Evaluation of elevated urinary enolase I levels in patients with endometriosis. *Biomarkers*. 2014;19(1):16-21.
181. Cho S., Choi Y.S., Yim S.Y., Yang H.I., Jeon Y.E., Lee K.E. Urinary vitamin D-binding protein is elevated in patients with endometriosis. *Human Reproduction*. 2012;27(2):515-522.
182. Cho S.H., Oh Y.J., Nam A., Kim H.Y., Park J.H., Kim J.H., Park K.H., Cho D.J., Lee B.S. Evaluation of serum and urinary angiogenic factors in patients with endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2007;58(6):497-504.

183. Grande G., Vincenzoni F., Milardi D., Pompa D., Ricciardi D., Fruscella E., Mancini F., Pontecorvi A., Castagnola M., Marana R. Cervical mucus proteome in endometriosis. *Clinical Proteomics*. 2017;14(1):7.

184. Wingeld M., O'Herilhy C., Finn M.M., Tallon D.F., Fottrell P.F. Follicular and luteal phase salivary progesterone in women with endometriosis and infertility. *Gynecological Endocrinology*. 1994;8(1):21-25.

185. Petrelluzzi K.F., Garcia M.C., Petta C.A., Grassi-Kassisse D.M., Spadari-Bratsch R. Salivary cortisol concentrations and quality of life in women with endometriosis and chronic pelvic pain. *Stress*. 2008;11(5):390-397.

186. Айламазян Э.К. и др. Классификации эндометриоза // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т.66, No2. – С. 77-92.

187. Burney R.O. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis / R. Burney, L. Giudice // *Fertil. Steril.* - 2012. – Vol. 3 (98). - P. 511–519.

188. Menakaya U. et al. Performance of ultrasound-based endometriosis staging system (UBESS) for predicting level of complexity of laparoscopic surgery for endometriosis // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* - 2016. – Vol. 6 (48). - P. 786– 795.

189. Nishida M. et al. Malignant transformation of ovarian endometriosis // *Gynecol. Obstet. Invest.* - 2000. – Vol. 1 (50). - P. 18–25.

190. Hull M.L. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease / M.L. Hull, V. Nisenblat // *Reprod. BioMed. Online.* – 2013. – Vol. 27. – P. 515-529.

191. Гаврилова Т.Ю. Аденомиоз: патогенез, диагностика, лечение, методы реабилитации: автореф. дис. д-ра мед. наук / Т.Ю. Гаврилова. – Москва, 2007. – С. 43.

192. Унанян А.Л. Эндометриоз и репродуктивное здоровье женщин / А.Л. Унанян // *Акушерство. Гинекология. Репродукция.* – 2010. – Т. 4, No 3. – С. 6- 11.

193. Dutta M. et al. A metabonomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis // *Molecular BioSystems.* - 2012. - Vol. 8. - No 12. - P. 3281–3287.

194. Vannuccini S., Reis F.M., Coutinho L.M., Lazzeri L., Centini G., Petraglia F. (2019). Surgical treatment of endometriosis: prognostic factors for better quality of life. *Gynecological Endocrinology* 2019, 1–5.
195. Fauconnier A. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications / A. Fauconnier, C. Chapron // *Hum. Reprod. Update.* – 2005. – Vol. 11, No 6. – P. 595-606.
196. Garrido N., Pellicer A., Remohi J., and Simon C. Uterine and ovarian function in endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2003; 21: 183–192
197. Pellicer A., Albert C., Garrido N., Navarro J., Remohi J. and Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000; 55: 109–119
198. Gupta S., Goldberg J.M., Aziz N., Goldberg E., Krajcir N., Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril.* 2008 Aug;90(2):247-57.
199. *Clin. Obstet. Gynecol.* Author manuscript; available in PMC 2015 Mar 2.
200. Arnaud Wattiez, keynote lecture 27th Annual ESGE Congress, 2018, Vienna.
201. Hart R.J., Hickey M., Maouris P., Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometrioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;2:CD004992.
202. Pellicano M., Bramante S., Guida M., Bifulco G., Di Spiezio Sardo A., Cirillo D., Nappi C. Ovarian endometrioma: postoperative adhesions following bipolar coagulation and suture. *Fertil Steril* 2008; 89:796–799.
203. Konstantinos Nirgianakis Lijuan Ma, Brett McKinnon, Michael D. Mueller, *Journal Clin Med*, 2020.
204. Koninckx P.R., Meuleman C., Demeyere S., Lesaffre E., Cornillie F.J. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril.* 1991 Apr; 55(4):759-65.

205. Bougie O., Yap M., Sikora L., Flaxman T., Singh S. Influence of race/ethnicity on prevalence and presentation of endometriosis: A systematic review and meta-analysis. *Bjog*. 2019; 126:1104–1115.
206. Wei S., Xu H., Kuang Y. Systematic enrichment analysis of microRNA expression profiling studies in endometriosis. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18:423-429.
207. Braza-Boïls A., Marí-Alexandre J., Gilabert J., Sánchez-Izquierdo D., España F., Estellés A., Gilabert- Estellés J. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Human Reproduction* 2014; 29:978-988.
208. Shi X.Y, Gu LIN., Chen JIE., Guo X.R., Shi Y.L. Downregulation of miR-183 inhibits apoptosis and enhances the invasive potential of endometrial stromal cells in endometriosis. *International Journal of Molecular Medicine* 2014; 33:59-67.
209. Yang R.Q., Teng H., Xu X.H., Liu S.Y., Wang Y.H., Guo F.J., Liu X.J. Microarray analysis of microRNA deregulation and angiogenesis-related proteins in endometriosis. *Genet Mol Res* 2016; 15.
210. Zhao L., Gu C., Ye M., Zhang Z., Li L., Fan W., Meng Y. Integration analysis of microRNA and mRNA paired expression profiling identifies deregulated microRNA-transcription factor-gene regulatory networks in ovarian endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16:4.
211. Laudanski P., Charkiewicz R., Tolwinska A., Szamatowicz J., Charkiewicz A., Niklinski J. Profiling of Selected MicroRNAs in Proliferative Eutopic Endometrium of Women with Ovarian Endometriosis. *Biomed Res Int* 2015; 2015:760698.
212. Saare M., Rekker K., Laisk-Podar T., Rahmioglu N., Zondervan K., Salumets A., Götte M., Peters M. Challenges in endometriosis miRNA studies — From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 2017; 1863:2282-2292.
213. Haikalis M.E., Wessels J.M., Leyland N.A., Agarwal S.K., Foster W.G. miRNA expression pattern differs depending on endometriosis lesion type. *Biol Reprod* 2018.

214. Agrawal S., Tapmeier T., Rahmioglu N., Kirtley S., Zondervan K., Becker C. The miRNA Mirage: How Close Are We to Finding a Non-Invasive Diagnostic Biomarker in Endometriosis? A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2018; 19.
215. Choi P.W., Ng S.W. The Functions of MicroRNA-200 Family in Ovarian Cancer: Beyond Epithelial- Mesenchymal Transition. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
216. Braicu O.L., Budisan L., Buiga R., Jurj A., Achimas-Cadariu P., Pop L., Braicu C., Irimie A., Berindan- Neagoe I. miRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded endometriosis and ovarian cancer samples. *OncoTargets and Therapy* 2017; Volume 10:4225-4238.
217. Filigheddu N., Gregnanin I., Porporato P.E., Surico D., Perego B., Galli L., Patrignani C., Graziani A., Surico N. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010; 2010:369549-369549.
218. Hawkins S.M., Creighton C.J., Han D.Y., Zariff A., Anderson M.L., Gunaratne P.H., Matzuk M.M. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol* 2011; 25:821-832.
219. Ohlsson Teague E.M., Van der Hoek K.H., Van der Hoek M.B., Perry N., Wagaarachchi P., Robertson S.A., Print C.G., Hull L.M. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009; 23:265-275.
220. Park S.-M.M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2, *Genes Dev.* 22 (2008) 894–907.
221. Eggers J., Martino V., Reinbold R., Schäfer S., Kiesel L., Starzinski-Powitz A., Schüring A., Kemper B., Greve B., Götte M. microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4, *Reprod. Biomed. Online.* 32 (2015) 434–445.
222. Saare M., Rekker K., Laisk-Podar T., Sõritsa D., Roost A., Simm J., Velthut-Meikas A., Samuel K., Metsalu T., Karro H., Sõritsa A., Salumets A., Peters M. High-throughput sequencing approach uncovers the miRNome of peritoneal endometriotic lesions and adjacent healthy tissues, *PLoS One.* 9 (2014) e112630.

223. Logan P.C., Yango P., Tran N.D. Endometrial Stromal and Epithelial Cells Exhibit Unique Aberrant Molecular Defects in Patients with Endometriosis, *Reprod. Sci.* (2017) 193371911770490.

224. Avgeris M., Stravodimos K., Fragoulis E.G., Scorilas A. The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients., *Br. J. Cancer.* 108 (2013) 2573–81.

225. Lima R.T., Busacca S., Almeida G.M., Gaudino G., Fennell D.A., Vasconcelos M.H. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer, *Eur. J. Cancer.* 47 (2011) 163–174.

226. Nasu K., Yuge A., Tsuno A., Nishida M., Narahara H. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis., *Histol. Histopathol.* 24 (2009) 1181–92.

227. Wang G., Mao W., Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells., *FEBS Lett.* 582 (2008) 3663–8.

228. Lodrini M., Oehme I., Schroeder C., Milde T., Schier M.C., Kopp-Schneider A., Schulte J.H., Fischer M., De Preter K., Pattyn F., Castoldi M., Muckenthaler M.U., A.E. Kulozik, F. Westermann, O. Witt, H.E. Deubzer, MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma., *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 6018–33.

229. Qiao D., Zeeman AM, Deng W., Looijenga L.H., Lin H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene.* 2002;21(25):3988–3999.

230. Lee J.H., Schutte D., Wulf G., Fuzesi L., Radzun H.J., Schweyer S., Engel W., Nayernia K. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet.* 2006;15(2):201–211.

231. Liu X., Sun Y., Guo J, Ma H., Li J, Dong B., Jin G., Zhang J., Wu J., Meng L., Shou C. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *International Journal Cancer.* 2006;118(8):1922–1929.

232. Chen L., Shen R., Ye Y., Pu X.A., Liu X., Duan W., Wen J., Zimmerer J., Wang Y., Liu Y., Lasky L.C., Heerema N.A., Perrotti D., Ozato K., Kuramochi-

Miyagawa S., Nakano T. et al. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS One*. 2007;2(3): e293.

233. Cheng J., Deng H., Xiao B., Zhou H., Zhou F., Shen Z., Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Letters*. 2012;315(1):12–17.

234. Cheng J., Guo J.M., Xiao B.X., Miao Y., Jiang Z., Zhou H., Li QN. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(17-18):1621–1625.

235. Rizzo F., Hashim A., Marchese G., Ravo M., Tarallo R., Nassa G., Giurato G., Rinaldi A., Cordella A., Persico M., Sulas P., Perra A., Ledda-Columbano G.M., Columbano A., Weisz A. Timed regulation of P-element-induced wimpy testis-interacting RNA expression during rat liver regeneration. *Hepatology*. 2014;60(3):798–806.

236. Li S., Meng L., Zhu C., Wu L., Bai X., Wei J., Lu Y., Zhou J., Ma D. The universal overexpression of a cancer testis antigen hiwi is associated with cancer angiogenesis. *Oncol Rep*. 2010; 23(4):1063-8.

237. Akhtar M.M., Micolucci L., Islam M.S., Olivieri F., Procopio A.D. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res* 2016; 44:24-44.

238. van Beijnum J.R., Giovannetti E., Poel D., Nowak-Sliwinska P., Griffioen A.W. miRNAs: micro- managers of anticancer combination therapies. *Angiogenesis* 2017; 20:269-285.

239. Ramon L.A., Braza-Boils A., Gilabert-Estelles J., Gilabert J., Espana F, Chirivella M, Estelles A. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod* 2011; 26:1082-1090.

240. Bedaiwy M.A., Alfaraj S., Yong P., Casper R. New developments in the medical treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 2017; 107:555-565.

241. Young V.J., Brown J.K., Saunders P.T., Horne A.W. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2013; 19:558-569.

242. Zhou H.E., Nothnick W.B. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci* 2005; 10:569-575.

243. Lee J, Banu S.K., Subbarao T., Starzinski-Powitz A., Arosh J.A. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasion of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of metalloproteinases. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332:306- 313.

244. Walton K.L., Johnson K.E., Harrison C.A. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Front Pharmacol* 8:461, 2017.

245. Nanthakumar C.B., Hatley R.J., Lemma S., Gauldie J., Marshall R.P., Macdonald S.J. Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox. *Nat Rev Drug Discov* 14:693-720, 2015.

246. Duffield J.S., Luper M., Thannickal V.J., Wynn T.A. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 8(1):241-276, 2013.

247. Follonier C.L., Gabbiani G., McCulloch C.A., Hinz B. Regulation of myofibroblast activities: calcium pulls some strings behind the scene. *Exp Cell Res* 316:2390-401, 2010.

248. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Prunotto M., Desmoulière A., Varga J., De Wever O., Mareel M., Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 180:1340-55, 2012.

249. Hu J., Zeng B., Jiang X., Hu L., Meng Y., Zhu Y., Mao M. The expression of marker for endometrial stem cell and fibrosis was increased in intrauterine adhesions. *Int J Clin Exp Pathol* 8:1525-34, 2015.

250. Szóstek-Mioduchowska A.Z., Lukasik K., Skarzynski D.J., Okuda K. Effect of transforming growth factor- β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology* 124:9-17, 2019.

251. Zhu H.Y., Ge T.X., Pan Y.B., Zhang S.Y. Advanced role of Hippo signaling in endometrial fibrosis: implications for intrauterine adhesion. *Chin Med J* 130:2732-2737, 2017.

252. Leask A., Abraham D.J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* 81:355-63, 2003.

253. Kular L., Pakradouni J., Kitabgi P., Laurent M., Martinerie C. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie* 93:377-88, 2011.
254. Uchio K., Graham M., Dean N.M., Rosenbaum J., Desmoulière A. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. *Wound Repair Regen* 12:60-6, 2004.
255. Xue X., Chen Q., Zhao G., Zhao J.Y., Duan Z., Zheng P.S. The Overexpression of TGF- β and CCN2 in intrauterine adhesions involves the NF- κ B signaling pathway. *PLoS One* 10: 0146159, 2015.
256. Vigano P., Candiani M., Monno A., Giacomini E., Vercellini P., Somigliana E. Time to redefine endometriosis including its profibrotic nature. *Hum. Reprod.* 2018, 33, 347–352.
257. Au H.K., Chang J.H., Wu Y.C., Kuo Y.C., Chen Y.H., Lee W.C., Chang T.S., Lan P.C., Kuo H.C., Lee K.L., et al. TGF-beta regulates cell migration through pluripotent transcription factor OCT4 in endometriosis. *PLoS ONE* 2015, 10, e0145256.
258. Chang J.H., Au H.K., Lee W.C., Chi C.C., Ling T.Y., Wang L.M., Kao S.H., Huang Y.H., Tzeng C.R. Expression of the pluripotent transcription factor OCT4 promotes cell migration in endometriosis. *Fertil. Steril.* 2013, 99, 1332–1339.
259. Zhang Q., Duan J., Liu X., Guo S.W. Platelets drive smooth muscle metaplasia and fibrogenesis in endometriosis through epithelial–mesenchymal transition and fibroblast to myofibroblast transdifferentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016, 428, 1–16.
260. Li J., Cen B., Chen S., He Y. MicroRNA-29b inhibits TGF-beta1-induced fibrosis via regulation of the TGF-beta1/Smad pathway in primary human endometrial stromal cells. *Mol. Med. Rep.* 2016, 13, 4229–4237.
261. Cheong Y.C., Shelton J.B., Laird S.M., Richmond M., Kudesia G., Li T.C., Ledger W.L. IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum. Reprod.* 2002, 17, 69–75.
262. Barcz E., Milewski Ł., Dziunycz P., Kamiński P., Płoski R., Malejczyk J. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: An inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. *Fertil. Steril.* 2012, 97, 1380–1386.

263. Monsanto S.P., Edwards A.K., Zhou J., Nagarkatti P., Nagarkatti M., Young S.L., Lessey B.A., Tayade C. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril*. 2016 105(4):968-977.
264. Lawson C., Al-Akoum M., Maheux R., Akoum A. Increased expression of interleukin-1 receptor type 1 in active endometriotic lesions. *Reproduction*. 2007; 133(1):265-74.
265. Tosato G., Jones K.D. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood*. 1990 Mar 15; 75(6):1305-10.
266. Akoum A., Lawson C., McColl S., Villeneuve M. Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to estradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. *Mol Hum Reprod*. 2001 Sep; 7(9):859-66.
267. Chishima F., Hayakawa S., Sugita K., Kinukawa N., Aleemuzzaman S., Nemoto N., Yamamoto T., Honda M. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*. 2002 48(1):50-6.
268. Ota H., Igarashi S., Sasaki M., Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 2001 Mar; 16(3):561-6.
269. Wu M.H., Lu C.W., Chuang P.C., Tsai S.J. Prostaglandin E2: the master of endometriosis? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010; 235(6):668-77.
270. Kouro T., Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol*. 2009; 21(12):1303-9.
271. Yang Y., Xiao X., Li F., Du L., Kijlstra A., Yang P. Increased IL-7 expression in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(2):1012-7.
272. Eisenberg V.H., Zolti M., Soriano D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev*. 2012 11(11):806-14.
273. Guerin P., El Mouatassim S., Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7:175–89.

274. Mansour G., Abdelrazik H., Sharma R.K., Radwan E., Falcone T., Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2009 ;91(5 Suppl):2079-86.

275. Zhang H., Niu Y., Feng J., Guo H. et al. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil. Steril.* 2006, 86, 274–282.

276. Stephens A.N., Hannan N.J., Rainczuk A., Meehan K.L. et al. Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. *J. Proteome Res.* 2010, 7, 2438–2449.

277. Rai P., Kota V., Deendayal M., Shivaji S. Differential proteome profiling of eutopic endometrium from women with endometriosis to understand etiology of endometriosis. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 4407–4419.

278. Fowler P.A., Tattum J., Bhattacharya S., Klonisch T. et al. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics* 2007, 7, 130–142.

279. Fassbender A., Verbeeck N., Bornigen D., Kyama C.M. et al. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Hum. Reprod.* 2012, 98, 117–125.

280. Ten Have S., Fraser I., Markham R., Lam A., Matsumoto I. Proteomic analysis of protein expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Proteomics Clin. Appl.* 2007, 1, 1243–1251.

281. Rai P., Shivaji S. The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One* 2011, 6, 18074

282. Satelli A., Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.* 2011, 68, 3033–3046.

283. Matsuzaki S., Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Hum. Reprod.* 2012, 27, 712–721.

284. Varma R., Rollason T., Gupta J.K., Maher E.R. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction* 2004, 127, 293–304.
285. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57–70.
286. Montgomery G.W., Nyholt D.R., Zhao Z.Z., Treloar S.A. et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum. Reprod. Update* 2008, 14, 447–457.
287. Vihinen P., Kahari V.M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 2002, 99, 157–166.
288. Lappin T.R.J., Grier D.G., Thompson A., Halliday H.L. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med. J.* 2006, 75, 23–31.
289. Kamarainen M., Halttunen M., Koistinen R., von Boguslawsky K. et al. Expression of glycodelin in human breast and breast cancer. *J. Cancer.* 1999, 83, 738–742.
290. Bulun S. E. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 268–279.
291. Bridges D., Moorhead, G.B.G. 14–3–3 Proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci. STKE* 2005, 296, 10.
292. Hermeking H. The 14–3–3 cancer connection. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 931–943.
293. Ciocca D.R., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005, 10, 86–103.
294. Wu W.X., Derks J.B., Zhang Q., Nathanielsz P.W. Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1996, 137, 5685–5693.
295. Pratt W.B. The hsp90-based chaperone system: Involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998, 217, 420–434.
296. Wataba K., Saito T., Fukunaka K., Ashihara K. et al. Overexpression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium. *Int. J. Cancer* 2001, 91, 448–456.

297. Gerke V., Moss, S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 331–371.
298. Bastian B.C. Annexins in cancer and autoimmune diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 1997, 53, 554–556.
299. Rodgers A.K., Falcone T. Treatment strategies for endometriosis. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9:243-255.

Приложения

Приложение 1

Визуальная аналоговая шкала боли (ВАШ)

Алгоритм прогнозирования и диагностики наружного генитального эндометриоза

