

©Д. А. Покровенко, М. В. Медведєв

Дніпровський державний медичний університет

## АЛГОРИТМ ЛІКУВАННЯ ЗОВНІШНЬОГО ГЕНІТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НОВИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

**Мета дослідження** – підвищити ефективність комплексного лікування зовнішнього генітального ендометріозу шляхом створення алгоритму з урахуванням особливостей клітинно-молекулярних маркерів.

**Матеріали та методи.** Все дослідження включило в себе чотири основні етапи: огляд літератури, ретроспективне дослідження ефективності медикаментозної терапії ендометріозу, проспективне дослідження з визначенням експресії мікро-РНК let-7 та miR-9 у сироватці крові жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом (далі ЗГЕ) різного ступеня тяжкості порівняно із групою контролю, розробку та перевірку ефективності нового алгоритму з урахуванням мікро-РНК let-7 та маркерів оваріального резерву (АМГ, КАФ). В основній проспективній частині досліджено зразки сироватки крові 88 жінок репродуктивного віку (від 21 до 45 років): контрольної групи жінок, які не мали даних за ендометріоз, у яких було проведено лапароскопічне втручання з іншого приводу, і групи ендометріозу, яку було поділено на дві підгрупи за класифікацією ASRM I–II і III–IV стадій. Останнім етапом було створення нового алгоритму на основі вже існуючих із використанням клітинно-молекулярних маркерів та перевірка його ефективності (група перевірки ефективності алгоритму, n=32).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведений аналіз за Манном–Уїтні показав достовірну різницю показників мікро-РНК let-7 між групами пацієнок з ендометріозом і пацієнок із групи контролю. На основі отриманих даних ROC-аналіз продемонстрував переваги мікро-РНК let-7 (чутливість, специфічність, прогностична цінність позитивних і негативних результатів) порівняно з мікро-РНК miR-9 та раковим антигеном CA-125. Медіана значення показника мікро-РНК let-7 склала 4,43 (0,88; 17,77), miR-9 – 0,11 (0,04; 0,56) ( $p>0,05$ ), у групі дослідження 1 середнє значення let-7  $8,43\pm 2,41$ ; у групі 2 –  $3,96\pm 1,28$  (ДІ 95 %); таким чином показник експресії мікро-РНК let-7 «4» було обрано для застосування в новому алгоритмі. При оцінці ефективності алгоритму рівень антимюллерового гормону до лікування в групі перевірки алгоритму становив  $1,03\pm 0,22$  та після –  $0,98\pm 0,19$  ( $p=0,35$ ), кількість антральних фолікулів –  $9,84\pm 1,83$  та  $8,97\pm 1,65$  відповідно ( $p=0,24$ ). Таким чином, у пацієнок, які пройшли через новий алгоритм, вдалось зберегти показники оваріального резерву та отримати ефект у зменшенні больового синдрому. Час до початку лікування зменшився в групі алгоритму в 4 рази завдяки використанню нового додаткового біомаркера ( $p=0,001$ ).

**Висновки.** Розроблений алгоритм із включенням нового неінвазивного біомаркера ЗГЕ дозволяє покращити діагностику цього захворювання та обрати ефективний метод лікування на початкових стадіях захворювання, зберегти оваріальний резерв у жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом завдяки диференційованому підходу до лікування. Мікро-РНК let-7 має кращі показники чутливості, специфічності, позитивних та негативних прогностичних значень, ніж раковий антиген CA-125.

**Ключові слова:** зовнішній генітальний ендометріоз; алгоритм лікування ендометріозу; мікро-РНК let-7; мікро-РНК miR-9; ПЛР у реальному часі; раковий антиген CA-125.

## АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

**Цель исследования** – повысить эффективность комплексного лечения наружного генитального эндометриоза путем создания алгоритма с учетом особенностей клеточно-молекулярных маркеров.

**Материалы и методы.** Всё исследование включило в себя четыре основных этапа: обзор литературы, ретроспективное исследование эффективности медикаментозной терапии эндометриоза, проспективное исследование для оценки специфичности биомаркера let-7 и miR-9 по сравнению с раковым антигеном CA-125, разработку и проверку эффективности нового алгоритма. В основной проспективной части исследованы образцы сыворотки крови 88 женщин репродуктивного возраста (от 21 до 45 лет): контрольной группы женщин, которые не имели данных об эндометриозе, у которых было проведено лапароскопическое вмешательство по другому поводу, и группы эндометриоза, которая была разделена на две подгруппы по классификации ASRM I–II и III–IV стадий. Последним этапом было создание нового алгоритма с использованием клеточно-молекулярных маркеров на основе уже существующих и проверка его эффективности (группа проверки эффективности алгоритма, n=32).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведенный анализ по Манну–Уитни показал достоверную разницу показателей микро-РНК let-7 между группами пациенток с эндометриозом и пациенток из группы контроля. На основе полученных данных ROC-анализ продемонстрировал преимущества микро-РНК let-7 (чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительных и отрицательных результатов) по сравнению с микро-РНК miR-9 и раковым антигеном CA-125. Медиана значения показателя микро-РНК let-7 составила 4,43 (0,88; 17,77), miR-9 – 0,11 (0,04; 0,56) ( $p>0,05$ ), в группе исследования 1 среднее значение let-7  $8,43\pm 2,41$ ; в группе 2 –  $3,96\pm 1,28$  (ДИ 95 %), таким образом, показатель экспрессии микро-РНК let-7 «4» был выбран для применения в новом алгоритме. При оценке эффективности алгоритма уровень антимюллерового гормона до лечения в группе проверки алгоритма составлял  $1,03\pm 0,22$  и после –  $0,98\pm 0,19$  ( $p=0,35$ ), количество антральных фолликулов –  $9,84\pm 1,83$  и  $8,97\pm 1,65$  соответственно ( $p=0,24$ ). Таким образом, у пациенток, прошедших через новый алгоритм, удалось сохранить показатели оваріального резерва и получить эффект в уменьшении болевого синдрома. Время до начала лечения уменьшилось в группе алгоритма в 4 раза благодаря использованию нового дополнительного биомаркера ( $p=0,001$ ).

**Выводы.** Разработанный алгоритм с включением нового неинвазивного биомаркера наружного генитального эндометриоза позволяет улучшить диагностику этого заболевания и выбрать эффективный метод лечения на начальных стадиях

заболевания, сохранить овариальный резерв у женщин с внешним генитальным эндометриозом благодаря дифференцированному подходу к лечению. Микро-РНК let-7 имеет лучшие показатели чувствительности, специфичности, положительных и отрицательных прогностических значений, чем раковый антиген CA-125.

**Ключевые слова:** наружный генитальный эндометриоз; алгоритм лечения эндометриоза; микро-РНК let-7; микро-РНК mir-9; ПЦР в реальном времени; раковый антиген CA-125.

#### ALGORITHM FOR TREATMENT OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS USING NEW MOLECULAR MARKERS

**The aim of the study** – to increase the effectiveness of complex treatment of external genital endometriosis by creating an algorithm taking into account the characteristics of cellular and molecular markers.

**Materials and Methods.** The whole study included four main stages: a literature review, a retrospective study of the effectiveness of drug therapy of endometriosis, a prospective study to determine the expression of microRNA let-7 and mir-9 in the serum of women with external genital endometriosis (hereinafter EGE) with the control group, development and verification of the effectiveness of a new algorithm taking into account let-7 microRNA and ovarian reserve markers (AMH, AFC). The main prospective part examined the serum samples of 88 women of reproductive age (21–45 years): the control group of women who had no data on endometriosis, who underwent laparoscopic intervention on another occasion, and the group of endometriosis, which was divided into two subgroups according to the classification of ASRM stages I–II and III–IV. The last step was to create a new algorithm based on existing ones using cell-molecular markers and check its effectiveness (algorithm efficiency test group, n = 32).

**Results and Discussion.** The performed analysis according to Mann-Whitney showed a significant difference in the parameters of micro-RNA let-7 between the groups of patients with endometriosis and patients from the control group. Based on the data obtained, the ROC analysis demonstrated the advantages of let-7 micro-RNA (sensitivity, specificity, predictive value of positive and negative results) compared to micro-RNA mir-9 and cancer antigen Ca-125. The median value of micro-RNA let-7 was 4.43 (0.88; 17.77), mir-9 0.11 (0.04; 0.56) ( $p > 0.05$ ), in study group 1 mean let-7 value ( $8.43 \pm 2.41$ ); in group 2 – ( $3.96 \pm 1.28$ ) (95 % CI), therefore, the microRNA expression index let-7 “4” was selected for use in the new algorithm. When evaluating the effectiveness of the algorithm, the level of anti-Müllerian hormone before treatment in the algorithm testing group was ( $1.03 \pm 0.22$ ) and after ( $0.98 \pm 0.19$ ) ( $p = 0.35$ ), the number of antral follicles was ( $9.84 \pm 1.83$ ) and ( $8.97 \pm 1.65$ ), respectively ( $p = 0.24$ ). Thus, in the patients who went through the new algorithm, it was possible to preserve the indicators of the ovarian reserve and obtain an effect in reducing the pain syndrome. The time to the start of treatment decreased by 4 times in the algorithm group due to the use of a new additional biomarker ( $p = 0.001$ ).

**Conclusions.** The new algorithm with the inclusion of a non-invasive biomarker of external genital endometriosis makes it possible to improve the diagnosis of this disease and to choose an effective method of treatment at the initial stages of the disease, to preserve the ovarian reserve in women with external genital endometriosis due to a differentiated approach to treatment. Micro-RNA let-7 has better indicators of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values than the cancer antigen CA-125.

**Key words:** external genital endometriosis; endometriosis treatment algorithm; let-7 microRNA; mir-9 microRNA; Fast Real-time PCR; cancer antigen-125.

**ВСТУП.** Ендометріоз є хронічним захворюванням, що знижує фертильність жінки та погіршує якість життя, негативно впливає на психічне здоров'я жінки. На сучасному етапі встановлення діагнозу відбувається шляхом візуалізації при хірургічному втручанні з гістологічною верифікацією. Деякі форми захворювання, зокрема ендометріодна кіста яєчників та глибокі інфільтративні вогнища, можуть бути виявлені за допомогою ультразвукового дослідження та магнітно-резонансної томографії. На сьогодні вважають, що наявність ендометріальних стромальних залоз в ектопічних ділянках може бути відправною точкою в патогенезі ендометріозу [1]. Всупереч цьому результати гістологічних досліджень зразків вогнищ ендометріозу показують у більшості випадків, що ендометріальні залози становлять лише незначний компонент цих уражень [2]. Хронічне запалення, спричинене наявністю фрагментів ектопічного ендометрія та активацією міофібробластів із розвитком фіброзної тканини, призводить до потенційних модифікацій епігенетичного програмування – аберантної регуляції транскрипції генів і посттрансляційних регуляторних механізмів через некодуєчі РНК [3]. Провівши аналіз публікацій іноземних колег, ми знайшли багато інформації про роль мікро-РНК let-7 в механізмі розвитку ендометріозу. Показано механізм, згідно з яким є зв'язок між довгою некодуєчою РНК H19, що знижує біодоступність мікро-РНК let-7, діючи як молекулярна губка. Вчені повідомляють, що експресія H19 істотно знижується в ектопічному ендометрії

жінок з ендометріозом порівняно з групою контролю. При зниженні експресії H19 збільшується активність let-7, що, в свою чергу, визначає шляхи регулювання H19/Let-7/IGF1R і може сприяти порушенню процесів в ендометрії та бути одним із механізмів розвитку ендометріозу та асоційованого з цим безпліддя. Проте методика визначення H19 дуже складна, H19 досить нестійка, а визначення let-7 можна провести при наявності ПЛР у реальному часі та відповідних реагентів для виділення мікро-РНК із біологічних речовин. Ще одна мікро-РНК звернула на себе увагу під час аналізу літератури – це mir-9, що згідно з даними авторів регулює процеси апоптозу, які при ендометріозі порушені [4–6].

Зміни в епігенетиці сприяють розвитку резистентності до прогестерону та посиленню реакції на естрогени, що є двома ключовими характеристиками жінок з ендометріозом, при цьому є дані літератури, що показники цих мікро-РНК корелюють між собою в тканинах вогнищ ендометріозу та плазмі крові хворих і можуть відрізнитись залежно від вираження фіброзу, тобто від стадії та розповсюдження хвороби й, відповідно, потенційно можуть свідчити про прогноз ефективності медикаментозного лікування [7]. При значно вираженому фіброзі часто постає питання низької ефективності медикаментозного лікування та необхідність саме хірургічного висічення ділянок фіброзу для ефективного подолання больового синдрому в таких жінок [8].

Багато досліджень останнього часу присвячено вивченню ролі стовбурових клітин кісткового мозку, що можуть бути причиною таких рідкісних випадків ендометріозу за межами черевної порожнини, як, наприклад, ендометріоз у легенях або головному мозку [9]. Міграція клітин може пояснити багато системних проявів ендометріозу, адже жінки з цим захворюванням частіше страждають від депресії, тривоги, аутоімунних захворювань і мають нижчий середній індекс маси тіла [10]. Всі ці дані вкотре підтверджують те, що для оцінки розповсюдження процесу, підбору адекватного лікування потрібно якомога більше даних. Особливо важливим напрямом став пошук неінвазивних молекулярно-генетичних маркерів, що можуть визначатись у крові хворого та доповнювати результати інших методів діагностики. З іншого боку, важливо розуміти ризики рецидиву захворювання, навіть після тривалої ремісії на фоні вагітності та періоду лактації, адже ендометріоз слід завжди розглядати як хронічне захворювання, яке потребує розробки плану довгострокового ведення пацієнтки з максимальним використанням медикаментозного лікування для запобігання повторним хірургічним втручанням. Терапія має тривати до настання вагітності або до віку менопаузи. Як терапію першої лінії застосовують прогестини, оральні контрацептиви, а також нестероїдні протизапальні засоби та інші анальгетики. На жаль, медикаментозна терапія ефективна приблизно у 70 % випадків, при цьому треба розуміти, що є досить суттєвий відсоток жінок, які планують вагітність та відмовляються від медикаментозної терапії [11].

*Обґрунтування нового алгоритму вибору лікувальної тактики у пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом*

Першою частиною роботи було проведення ретроспективного дослідження, метою якого було проаналізувати особливості медикаментозної терапії пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом залежно від

репродуктивних планів та головної скарги жінки на момент звернення. Проаналізувавши історію лікування 200 жінок, виявили, що провідними симптомами зовнішнього генітального ендометріозу є безпліддя (54,0 % (95 % ДІ 47,1–60,9)) і тазовий біль (48 % (95 % ДІ 41,0–61,2)). Поєднання цих симптомів зустрічали у 16 % пацієнток. Хірургічне лікування отримали 59,9 % ( $p < 0,001$ ), при цьому в 24,5 % жінок було проведено цистектомію ( $p < 0,001$ ). Підвищений рівень СА-125 спостерігали у 39,5 % обстежених жінок, УЗД-ознаки ендометріозу було визначено у 53,5 % пацієнток, статистично значущі розбіжності між групами пацієнток, які приймали гормональне лікування до чи після хірургічного втручання, були відсутні ( $p = 0,181$ ). Ознаки ендометріозу на МРТ було визначено у 19,0 % з числа усіх жінок, найчастіше ендометріоз поєднувався із міомою матки ( $p = 0,005$ ). Тривалість захворювання серед усіх жінок становила 36,0 (18,0; 48,0) місяців ( $p = 0,01$ ). Гормональне лікування після хірургії отримали 48,5 % жінок, найчастіше призначали дієногест – 32 % ( $p < 0,001$ ). Прийом препаратів коливався від 3-х до 60 місяців та складав у середньому 6,0 (3,0; 9,0) місяців [12].

У більшості випадків вибір тактики лікування проводили на основі Уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги наказу МОЗ № 319 від 06.04.2016 року «Тактика ведення пацієнток з генітальним ендометріозом», алгоритм з якого наведено нижче (рис. 1) [13].

При проведенні ретроспективного аналізу амбулаторних карт було відзначено, що не завжди враховувались всі сучасні можливості репродуктології, зокрема можливість вітрифікації ооцитів чи ембріонів. Високий відсоток хірургічних втручань для лікування та діагностики ендометріозу інколи призводив до фатального зниження оваріального резерву, і поставало питання про необхідність застосування донаційних ооцитів у циклах ЕКЗ, тоді



Рис. 1. Алгоритм лікування ендометріозу (відповідно до наказу № 319 МОЗ України від 06.04.2016 р.).

як у деяких випадках можна було провести процедуру склеротерапії яєчників при ендометріомах, більших за 3 см, та безпечну індукцію овуляції чи суперовуляції з отриманням яйцеклітин жінки і тільки після цього переходити до наступних етапів лікування [14–16].

Міжнародно визнаний алгоритм ESHRE від 2014 року включає в себе 4 базові підходи до лікування ендометріозу: 1) консервативну терапію; 2) симптоматичну терапію; 3) хірургічне лікування; 4) комбіноване лікування [17]. Ці алгоритми мають багато важливих базових етапів, проте з моменту їх розробки минуло більше 5 років, а сучасні досягнення в напрямках епігенетики, генетики та репродуктивної медицини останніх років створюють передумови для доповнення деяких етапів.

Після детального аналізу літератури та сучасних досліджень із пошуку неінвазивних біомаркерів ендометріозу ми почали власне дослідження серед пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом, які проходили лапароскопічне оперативне втручання та мали, відповідно, підтверджену гістологічну верифікацію діагнозу.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Метою дослідження було знайти зв'язок між формою та розповсюдженням процесу та рівнями специфічних мікро-РНК let-7 та miR-9 порівняно з контрольним геном U6 у сироватці крові, що б дозволило використовувати ці показники як неінвазивні біомаркери. Ми дослідили зразки сироватки крові 88 жінок репродуктивного віку (від 21 до 45 років): контрольної групи жінок, які не мали даних за ендометріоз, мали лапароскопічне втручання з іншого приводу, та групи ендометріозу, яку було поділено на дві підгрупи за класифікацією ASRM I–II та III–IV стадій. Всім пацієнткам проводили лапароскопічне хірургічне лікування в одному медичному центрі з підтвердженням гістологічного діагнозу після повного клінічного та лабораторного обстеження.

Медіана значення показника мікро-РНК let-7 склала 4,43 (0,88; 17,77), miR-9 – 0,11 (0,04; 0,56) ( $p > 0,05$ ), у групі дослідження 1 середнє значення let-7 становило  $8,43 \pm 2,41$ ; у групі 2 –  $3,96 \pm 1,28$  (ДІ 95 %). При проведенні кореляційного аналізу «мікро-РНК let-7» з «ASRM бали» та показники «Ендометріоз (+/-)» з «мікро-РНК let-7» мали сильну негативну кореляцію (-0,64) та (-0,67) відповідно. При проведенні кореляційного аналізу «мікро-РНК miR-9» з «ASRM бали» та показники «Ендометріоз (+/-)» з «мікро-РНК miR-9» мали слабку негативну кореляцію (-0,32) та (-0,2) відповідно. При порівняльному аналізі з іншим біомаркером CA-125, що доступний до визначення в крові у пацієнток із генітальним ендометріозом, мікро-РНК let-7 показав кращі параметри чутливості, специфічності, прогностичної цінності позитивних і негативних результатів. При проведенні ROC-аналізу: для мікро-РНК let-7 (AUC – 93,5 %) та для CA-125 (AUC – 88,8 %) відповідно.

Таким чином, вимірювання мікро-РНК let-7 є перспективним для рутинного використання у пацієнтів з ендометріозом, цей клітинно-молекулярний маркер показав кращі показники специфічності та чутливості, ніж CA-125. Мікро-РНК miR-9, на жаль, незважаючи на дані інших досліджень [19], у нашій вибірці не показав достовірної різниці в значеннях, тому ми не включили цей біомаркер в оновлений алгоритм вибору лікувальної тактики у жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом.

На основі отриманих даних було розроблено новий алгоритм вибору тактики лікування зовнішнього геніталь-

ного ендометріозу, який включає базові етапи вже існуючих алгоритмів та враховує показник неінвазивного клітинно-молекулярного маркера ендометріозу let-7 менше 4 як предиктор тяжкої форми ендометріозу. Обов'язковим є визначення показників оваріального резерву жінок, що планують вагітність. Методики ДРТ використовуються на ранніх етапах у пацієнток із низькими показниками антимюллерового гормону та кількості антральних фолікулів.

У пацієнток, які не планують вагітність та головною скаргою яких є больовий синдром, проводиться емпіричне медикаментозне лікування прогестинами (діногест 2 мг у безперервному режимі). При відсутності ефекту від лікування протягом 3-х місяців проводиться визначення мікро-РНК let-7, якщо він нижчий за 4, тоді рекомендовано хірургічне лікування через високу імовірність наявності резистентності прогестеронових рецепторів.

Лапароскопічне лікування ендометріозу в пацієнток із рівнем мікро-РНК let-7 більше 4 може бути проведено підготовленим спеціалістом, який володіє навичками хірургії ендометріозу (передбачається втручання середнього ступеня складності: коагуляція та/або висічення вогнищ поверхневого ендометріозу, адгезіолізис, цистектомія).

При рівні мікро-РНК let-7 менше 4 хірургічне втручання повинно проводитись в експертних центрах з лікування зовнішнього генітального ендометріозу – багатопрофільних лікарнях із підготовленими спеціалістами, які володіють навичками лапароскопічної хірургії ендометріозу, та суміжними спеціалістами: загальним хірургом, торакальним хірургом, урологом (передбачається втручання високого рівня складності, враховуючи високі ризики наявності ураження ендометріозом супутніх органів – сечоводів, сечового міхура, кишечника, діафрагми).

У пацієнток перед циклом контрольованої оваріальної стимуляції в циклах екстракорпорального запліднення із ендометріїдними кістами яєчника діаметром більше 3 см та зниженим оваріальним резервом, які мали хірургічне втручання з приводу ендометріозу в анамнезі з верифікованим діагнозом зовнішнього генітального ендометріозу, рекомендовано проведення склеротерапії кісти яєчника з цитологічним вмістом аспірату для збереження власного потенціалу яєчників.

Проведення екстракорпорального запліднення як перша лінія терапії у пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом показано при зниженні оваріального резерву та неефективності інших методик допоміжних репродуктивних технологій – індукції овуляції, внутрішньоматкової інсемінації або при поєднанні декількох факторів безпліддя (чоловічий, трубний) чи потребі доімплантаційної діагностики ембріона.

У пацієнток із кістами яєчника необхідно визначати рівень CA-125 в сироватці венозної крові (рис. 2).

#### *Перевірка ефективності нового алгоритму*

Для перевірки ефективності алгоритму було додатково набрано проспективну групу 3, в яку увійшли 32 жінки із зовнішнім генітальним ендометріозом. Дані цієї групи було порівняно із групами ендометріозу 1 та 2, всі жінки в яких пройшли лапароскопічне лікування ендометріозу. Всім жінкам було проведено стандартизований клінічний огляд, визначення головної скарги з оцінкою больового синдрому за візуальною аналоговою шкалою (ВАШ) в міліметрах (0 – відсутність болю; 100 мм – найгірший можливий біль).

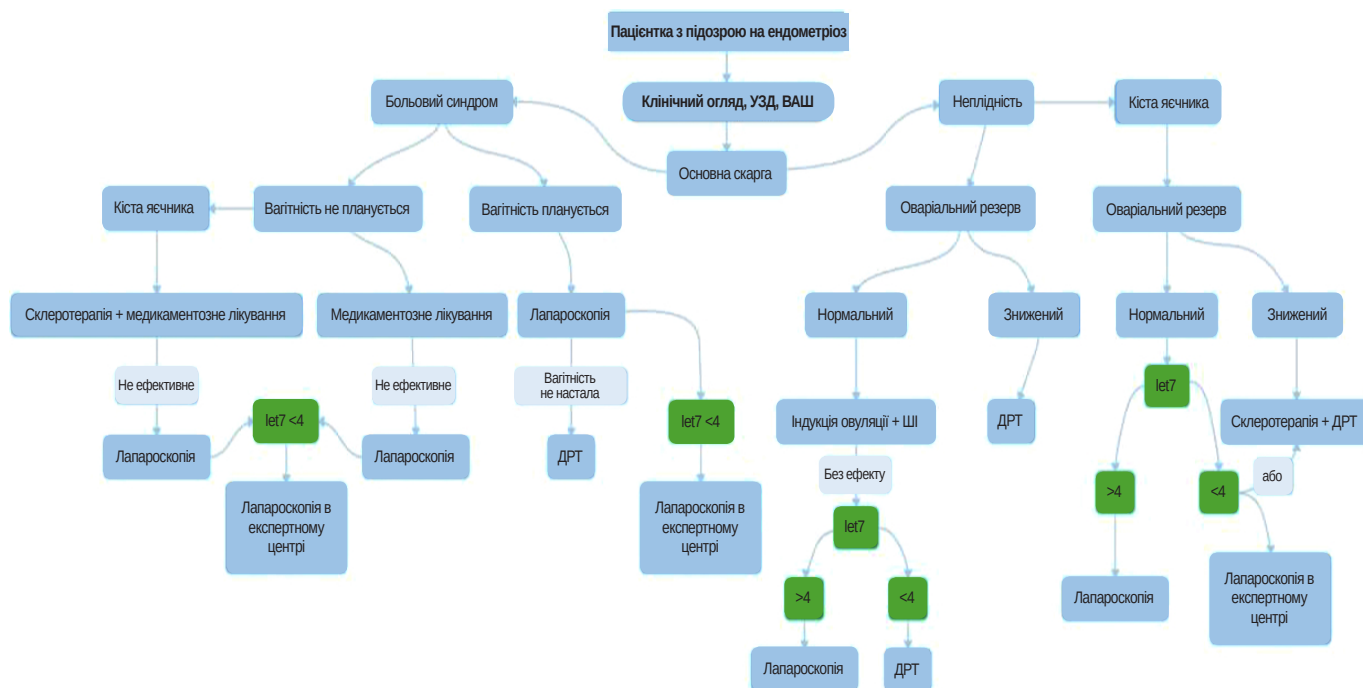


Рис. 2. Алгоритм вибору лікувальної тактики у жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом.

Ультразвукове дослідження органів малого таза з використанням трансвагінального датчика 7–12 МГц та конвексного датчика 3,5–8 МГц. Оцінку оваріального резерву при наявності репродуктивних планів проводили за допомогою підрахунку антральних фолікулів (далі КАФ – кількість антральних фолікулів) та визначення антимюллерового гормону (далі АМГ) за методом ECLIA – імунохімічний з електрохемілюмінесцентною детекцією, аналізатор та тест-система Cobas 6000, Roche Diagnostics (Швейцарія). Знижений оваріальний резерв визначали, коли рівень АМГ був нижчий за 1нг/мл та КАФ була нижча за 5–7 антральних фолікулів в обох яєчниках [18].

Пацієнткам проводили визначення експресії мікро-РНК let-7 за допомогою методу ПЛР у реальному часі. Забір крові для визначення рівня мікро-РНК проводили перед анестезією та введенням будь-яких ліків у пробірки з EDTA К 2,7 ml. На першому етапі використано реактив RNA-GO для отримання високоякісної загальної РНК із зразків сироватки (за допомогою NanoDrop-1000). Наступним кроком було проведення зворотної транскрипції для мікро-РНК let-7 та порівняння із контрольним геном U6 (використано комплект зворотної транскрипції мікро-РНК Tap Map). Отримані результати досліджували за допомогою програмного забезпечення «7500 Fast Real-time PCR» («Applied Biosystems», США) співробітники сертифікованої лабораторії інституту ім. О. Богомольця, м. Київ. Усі дані представлено у вигляді арифметичних даних (середні значення±SD).

Основні статистичні характеристики, що використовуються при описанні даних, включають: кількість спостережень (n), ліміт – min (max) мінімальне (максимальне) значення; 95 % довірчий інтервал (95 % ДІ); відносні величини – %, рівень статистичної значущості (p). Критичне значення рівня статистичної значущості для всіх видів аналізу приймали на рівні  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Клініко-лабораторне обстеження жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом показало, що більшість пацієнок мала нормальний індекс маси тіла: для групи дослідження 1+2 показник склав  $20,2 \pm 0,71$  (ДІ 95 %), для групи перевірки алгоритму, відповідно,  $21,4 \pm 0,88$  (ДІ 95 %).

Безпліддя як основний симптом жінки визначали в 2,6 раза частіше, ніж тазовий біль; при цьому третина жінок вже мала в анамнезі лапароскопічне втручання та 10 % мали негативну спробу екстракорпорального запліднення. За структурою безпліддя: первинне – 67,5 % та вторинне – 32,5 % ( $p = 0,001$ ).

Середня тривалість періоду до початку лікування для пацієнок 1 та 2 груп склала  $28,73 \pm 2,23$  (ДІ 95 %) через труднощі з діагностикою захворювання, а в групі перевірки алгоритму –  $7,41 \pm 1,39$  місяця (ДІ 95 %), тобто в 4 рази менше часу знадобилось для діагностики та прийняття клінічного рішення про початок лікування.

Показники оваріального резерву були знижені в 1,5 раза в групі ендометріозу до початку лікування, показник інтенсивності болю до початку лікування склав  $61,6 \pm 4,31$  у групі ендометріозу 1+2 та  $60,7 \pm 7,79$  у групі перевірки алгоритму за Візуальною аналоговою шкалою, що відповідає помірному болю (табл. 1).

Перевірка ефективності запропонованого алгоритму з урахуванням нового неінвазивного клітинно-молекулярного маркера дозволила зменшити показники рівня болю за шкалою ВАШ після лікування в 2 рази: до лікування  $60,72 \pm 6,22$  та після  $29,5 \pm 3,74$  ( $p < 0,001$ ).

У групі дослідження 1 показник ВАШ у міліметрах склав до лікування  $56,48 \pm 6,19$  та  $22,45 \pm 4,51$  після ( $p < 0,001$ ), в групі 2, відповідно:  $65,86 \pm 5,69$  та  $23,34 \pm 3,80$  ( $p < 0,001$ ).

Рівень антимюллерового гормону в групі перевірки алгоритму до лікування склав  $1,03 \pm 0,22$  та після –  $0,98 \pm 0,19$  ( $p = 0,35$ ), кількість антральних фолікулів –  $9,84 \pm 1,83$  та

Таблиця 1. Характеристики основних показників пацієнок із ЗГЕ групи ендометріозу 1 та 2 та групи перевірки алгоритму

Параметр	Об'єднана основна група 1+2 (n=64)	STDEV	CONFIDENCE	Група 3 (n=32)	STDEV	CONFIDENCE	p-value (t-test)	Результат
ВАН (бали)	61,6	17,60	61,6±4,31	60,7	31,80	60,7±7,79	0,82	статистично не відрізняються
АМГ	0,94	0,77	0,94±0,19	1,03	0,63	1,03±0,15	0,81	статистично не відрізняються
КАФ	9,1	5,14	9,1±1,26	9,8	5,29	9,8±1,3	0,77	статистично не відрізняються
Вік, роки	32,7	5,85	32,7±1,43	32,8	5,49	32,8±1,34	0,99	статистично не відрізняються
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	20,2	2,91	20,2±0,71	21,4	2,53	21,4±0,62	0,37	статистично не відрізняються
Рівень СА-125, ОД/мл	67,1	26,48	67,1±6,49	63,3	24,15	63,3±5,92	0,77	статистично не відрізняються
Рівень let-7	6,08	12,22	6,08±2,99	5,99	5,41	5,99±1,33	1,00	статистично не відрізняються
Час до початку лікування (в місяцях)	28,73	9,10	28,73±2,23	7,41	4,00	7,41±1,39	0,00016862	різниця достовірна
Основний симптом болювий, абс. ч. (%)	16 (25)			11 (34,4)				н/д
Основний симптом неплідність, абс. ч. (%)	48 (65)			21 (65,6)				н/д
Лапароскопія з приводу ендометріозу в анамнезі, абс. ч. (%)	23 (35,9)			9 (28,1)				н/д

8,97±1,65 відповідно (p=0,24) (табл. 2). Таким чином, у пацієнок, які пройшли через новий алгоритм, вдалось зберегти показники оваріального резерву та отримати ефект у зменшенні болювого синдрому.

У групі дослідження 1 антимюллерів гормон до лікування склав 1,36±0,31 та після – 0,81±0,17 (p=0,002), кількість антральних фолікулів – 12,00±1,84 та 8,28±1,63 відповідно (p=0,002). Тобто після лікування визначали зниження показників оваріального резерву в 1,5 раза.

У групі дослідження 2 показники оваріального резерву були найнижчими: антимюллерів гормон до лікування становив 0,60±0,16 та після – 0,45±0,13 (p=0,077), кількість антральних фолікулів – 6,74±1,29 та 4,20±0,83 відповідно (p<0,001). Для пацієнок цієї групи важли-

вість збереження оваріального резерву для виконання дітородної функції із власними яйцеклітинами найбільш актуальна, враховуючи початково знижені показники АМГ та КАФ при середньому та тяжкому ендометріозі. Час до початку лікування зменшився в групі алгоритму в 4 рази завдяки використанню нового додаткового біомаркера (p=0,001).

**ВИСНОВКИ.** Показник експресії мікро-РНК let-7 має кращі показники чутливості, специфічності, позитивних та негативних прогностичних значень, ніж раковий антиген СА-125. Розроблений алгоритм вибору лікувальної тактики у жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом із включенням нового неінвазивного клітинно-молекулярного маркера дозволяє покращити діагностику цього

Таблиця 2. Порівняння до та після лікування в групі перевірки ефективності алгоритму

Параметр	Група перевірки алгоритму до лікування (n=32)			Група перевірки алгоритму після лікування (n=32)			p-val
	середнє значення	середнє відхилення	ДІ	середнє значення	середнє відхилення	ДІ	
Рівень болю за шкалою ВАШ (мм)	60,72	17,96	60,72±6,22	29,5	10,81	29,5±3,74	<0,001
Рівень АМГ	1,03	0,63	1,03±0,22	0,98	0,56	0,98±0,19	0,35
КАФ	9,84	5,29	9,84±1,83	8,97	4,76	8,97±1,65	0,24

захворювання та обрати ефективний метод лікування на початкових стадіях захворювання, зберегти оваріальний резерв у жінок репродуктивного віку та зменшити час до початку лікування.

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Напрямок епігенетики є перспективним для вивчення: використання мікро-РНК можливе не тільки з метою ранньої діагностики та вибору лікувальної тактики; сьогодні є

розробки щодо введення мікро-РНК let-7 із лікувальною метою для зниження ризиків рецидиву після хірургічного лікування та прогресування зовнішнього генітального ендометріозу. Потрібні подальші дослідження епігенетичного профілю жінок із ендометріозом для визначення можливих механізмів впливу на гени, що відповідають за розвиток цього хронічного захворювання, яке знижує фертильність та якість життя жінок у усьому світі.

*Всі норми біоетики під час досліджень були дотримані. Автори не мали конфлікту інтересів.*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Menstruation: science and society / H. O. D. Critchley, E. Babayev, S. E. Bulun [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2020. – Vol. 223 (5). – P. 624–664. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.06.004.
- A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility / J. Prescott, L. V. Farland, D. K. Tobias [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 31 (7). – P. 1475–1482.
- Circulating miRNAs related to epithelial–mesenchymal Transitions (EMT) as the new molecular markers in endometriosis / A. Zubrzycka, M. Migdalska-Sęć, S. Jędrzejczyk, E. Brzezińska-Lasota // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 43 (2). – P. 900–916.
- Endometriosis: pathogenesis and treatment / P. Vercellini, P. Viganò, E. Somigliana, L. Fedele // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 261–275.
- Effect of surgery on ovarian reserve in women with endometriomas, endometriosis and controls / L. R. Goodman, J. M. Goldberg, R. L. Flyckt [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2016. – Vol. 215 (5). – P. 589e1–589e6.
- Медведєв М. В. Ефективність медикаментозної терапії у комплексному лікуванні ендометріозу: ретроспективний аналіз даних / М. В. Медведєв, Д. А. Покровенко // *Збірник праць асоціації акушерів-гінекологів України.* – 2019. – № 2. – С. 104–110.
- H19 lncRNA alters stromal cell growth via IGF signaling in the endometrium of women with endometriosis / S. Ghazal, B. McKinnon, Z. Jichun [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2015. – Vol. 7 (8). – P. 996–1003.
- Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome / S. Vannuccini, V. L. Clifton, I. S. Fraser [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2016. – Vol. 22 (1). – P. 104–115.
- Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain / S. Milingos, A. Protopapas, P. Drakakis [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 997. – P. 269–273.
- Management of women with endometriosis. Guideline ESHRE / G. Dunselman, N. Vermeulen, C. Becker [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol. 29. – P. 400–412.
- Mechanisms of endometrial progesterone resistance / M. Al-Sabbagh, E. W. Lam, J. J. Brosens // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 358 (2). – P. 208–215.
- MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis / E. M. Ohlsson Teague, K. H. Van der Hoek, M. B. Van der Hoek [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 23 (2). – P. 265–275.
- Тактика ведення пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом : наказ МОЗ України № 319 від 06.04.2016.
- Recent insights on the genetics and epigenetics of endometriosis / B. Borghese, K. T. Zondervan, M. S. Abrao [et al.] // *Clin. Genet.* – 2017. – Vol. 91 (2). – P. 254–264.
- Serum anti-mullerian hormone in reproductive aged women with benign ovarian cysts / E. Somigliana, M. A. Marchese, M. P. Frattaruolo [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2014. – Vol. 180. – P. 142–147.
- Медведєв М. В. Сучасний погляд на етіологію, патогенез та можливості діагностики зовнішнього генітального ендометріозу (огляд літератури) / М. В. Медведєв, Д. А. Покровенко // *Медичні перспективи.* – 2019. – № 1. – С. 21–30.
- Venetis C. A. The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward / C. A. Venetis // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol. 29 (9). – P. 1839–1841.
- Alderman M. H. 3<sup>rd</sup>. The systemic effects of endometriosis / M. H. Alderman 3<sup>rd</sup>, N. Yoder, H. S. Taylor // *Semin. Reprod. Med.* – 2017. – Vol. 35 (3). – P. 263–270.
- Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature / P. Viganò, M. Candiani, A. Monno [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2017. – Vol. 33 (3). – P. 347–352.

## REFERENCES

- Critchley, H.O.D., Babayev, E., Bulun, S.E., Clark, S., Garcia-Grau, I., Gregersen, P.K., ..., & Griffith, L.G. (2020). Menstruation: science and society. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 223 (5), 624-664. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.06.004.
- Prescott, J., Farland, L.V., Tobias, D.K., Gaskins, A.J., Spiegelman, D., Chavarro, J.E., ..., & Missmer, S.A. (2016). A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. *Hum. Reprod.*, 31 (7), 1475-1482. DOI: 10.1093/humrep/dew085.
- Zubrzycka, A., Migdalska-Sęk, M., Jędrzejczyk, S., & Brzezińska-Lasota, E. (2021). Circulating miRNAs related to Epithelial-Mesenchymal Transitions (EMT) as the new molecular markers in endometriosis. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 43 (2), 900-916. DOI: 10.3390/cimb43020064.
- Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2013). Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 10, 261-275. DOI: 10.1038/nrendo.2013.255.
- Goodman, L.R., Goldberg, J.M., Flyckt, R.L., Gupta, M., Harwalker, J., & Falcone, T. (2016). Effect of surgery on ovarian reserve in women with endometriomas, endometriosis and controls. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 215 (5), 589e1-589e6. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.05.029.
- Medvedyev, M.V., & Pokrovenko, D.A. (2019). Efektyvnist medykamentoznoi terapii u kompleksnomu likuvanni endometriozu: retrospektyvnyi analiz danykh [Effectiveness of drug therapy in the complex treatment of endometriosis: retrospective data analysis]. *Zbirnyk prats assotsiatsii akusheriv-hinekologiv Ukrainy – Coll. of Work of Association of Obstetricians and Gynecologists of Ukraine*, 2, 104-110 [in Ukrainian].
- Ghazal, S., McKinnon, B., Zhou, J., Mueller, M., Men, Y., Yang, L., ..., & Taylor, H.S. (2015). H19 lncRNA alters stromal cell growth via IGF signaling in the endometrium of women with endometriosis. *EMBO Mol. Med.*, 7 (8), 996-1003. DOI: 10.15252/emmm.201505245.
- Vannuccini, S., Clifton, V.L., Fraser, I.S., Taylor, H.S., Critchley, H., Giudice, L.C., & Petraglia, F. (2016). Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. *Hum. Reprod. Update*, 22 (1), 104-115. DOI: 10.1093/humupd/dmv044.
- Milingos, S., Protopapas, A., Drakakis, P., Liapi, A., Loutradis, D., Kallipolitis, G., ..., & Michalas, S. (2003). Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 997, 269-273. DOI: 10.1196/annals.1290.030.
- Dunselman, G.A., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., ..., & Nelen, W. (2014). Guideline ESHRE: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, 29, 400-412.
- Al-Sabbagh, M., Lam, E.W., & Brosens, J.J. (2012). Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 358 (2), 208-215. DOI: 10.1016/j.mce.2011.10.035.
- Ohlsson Teague, E.M., VanderHoek, K.H., VanderHoek, M.B., Perry, N., Wagaarachchi, P., Robertson, ..., & Hull, L.M. (2009). MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol. Endocrinol.*, 23 (2), 265-275. DOI: 10.1210/me.2008-0387.
- (2016). Takyka vedennia patsientok iz zovnishnym henitalnym endometriozom [Tactics of management of patients with external genital endometriosis]. *Nakaz Ministerstva okhohrony zdorovia Ukrainy vid 06.04.2016 № 319 – Order of the Ministry of Health of Ukraine Of April 6, 2016 No. 319* [in Ukrainian].
- Borghese, B., Zondervan, K.T., Abrao, M.S., Chapron, C., & Vaiman, D. (2017). Recent insights on the genetics and epigenetics of endometriosis. *Clin. Genet.*, 91 (2), 254-264. DOI: 10.1111/cge.12897.
- Somigliana, E., Marchese, M.A., Frattaruolo, M.P., Berlanda, N., Fedele, L., & Vercellini, P. (2014). Serum antimüllerian hormone in reproductive aged women with benign ovarian cysts. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 180, 142-147. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.06.009.
- Medvedyev, M.V., & Pokrovenko, D.A. (2019). Suchasnyi pohliad na etiologiiu, patohenez ta mozhlyvosti diahnozyky zovnishnoho henitalnoho endometriozu (ohliad literatury) [Modern view on the etiology, pathogenesis and possibilities of diagnosis of external genital endometriosis (literature review)]. *Medychni perspektyvy – Medical Perspectives*, 1, 21-30 [in Ukrainian].
- Venetis, C.A. (2014). The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward. *Hum. Reprod.*, 29 (9), 1839-1841. DOI: 10.1093/humrep/deu138.
- Alderman, M.H. 3rd, Yoder, N., & Taylor, H.S. (2017). The systemic effects of endometriosis. *Semin. Reprod. Med.*, 35 (3), 263-270. DOI: 10.1055/s-0037-1603582.
- Vigano, P., Candiani, M., Monno, A., Giacomini, E., Vercellini, P., & Somigliana, E. (2017). Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Hum. Reprod.*, 33 (3), 347-352. DOI: 10.1093/humrep/dex354.

Отримано 10.11.21

Прийнято до друку 08.12.21

Електронна адреса для листування: dasha2389@yahoo.com