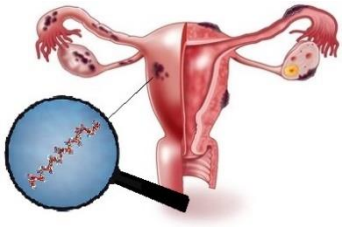
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

Д-Р ВИКТОРИЯ ЛАЗАРОВА СПАСОВА

МИКРОРНК ЕКСПРЕСИОНЕН ПРОФИЛ НА ЕНДОМЕТРИОЗА В РАЗЛИЧЕН СТАДИЙ



А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане

на образователна и научна степен “ДОКТОР”

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Генетика

София, 2021 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА
РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, ДМ

Д-Р ВИКТОРИЯ ЛАЗАРОВА СПАСОВА

МИКРОРНК ЕКСПРЕСИОНЕН ПРОФИЛ НА ЕНДОМЕТРИОЗА В РАЗЛИЧЕН СТАДИЙ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Генетика

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ПРОФ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, ДМ
АКАД. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДМ, ДБН

НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ:

ПРЕДСЕДАТЕЛ: Доц. д-р Даниела Авджиева-Тзавелла, дм - становище

Проф. д-р Асен Николов, дм - рецензия

Проф. Д-р Вили Стоянова, дм – становище

Доц. д-р Радослава Въжарова, дм - рецензия

Проф. д-р Стоян Лалчев, дм – становище

София, 2021 г.

Изследванията в настоящия дисертационен труд са финансирани по проект „Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез миРНК експресионно профилиране“, № Д-212/12.12.2018 от конкурса „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения - 2018” на Съвета по медицинска наука към Медицински университет-София.

Изследванията са извършени в Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Докторантът е задочен докторант към Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София (Заповед за зачисляване РК 36-2735/30.11.18).

Дисертацията обхваща 157 машинописни страници и включва 18 фигури, 19 таблици и 5 приложения, оформени в 10 раздела. Библиографията обхваща 415 източника, от които 87 са публикувани през последните 5 години.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по Медицинска генетика към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 13.07.2021 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Медицинска генетика, 6-ти етаж на СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. „Здраве”2, София, 1431.

Защитата ще се състои на …… от …. в ……..

Автор: д-р Виктория Лазарова Спасова

Заглавие: МикроРНК експресионен профил на ендометриоза в различен стадий.

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”, шифър 7.

Професионално направление: „Медицина”, шифър 7.1.

Докторска програма: Медицинска генетика

Съдържание

Използвани в текста съкращения iii
Въведение 1
I. Цел и задачи 2
II. Материали и методи 3
1. Материали 3
1.1 Участници в проучването 3
1.2 Биологични проби 4
1.2.1 Кръвни проби 5
1.2.2 Тъканни проби 5
2. Методи 6
2.1 Клиничен въпросник 6
2.2 Изолиране на ДНК и РНК от кръвните проби 6
2.1.1 Техника на изолиране на РНК 6
2.1.2 Техника на изолиране на ДНК 8
2.2 Изолиране на РНК от тъканните проби 10
2.3 Създаване на РНК биобанка 13
2.4 Създаване на ДНК биобанка 13
2.5 Формиране на клинични групи и сборни проби 13
2.6 Обратна транскрипция на сборните проби 14
2.7 Експресионен анализ на зрели миРНК 16
2.7.1 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от RT-PCR върху миРНК чипове 18
2.7.2 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от тъкан с RT-PCR върху миРНК чипове 19
2.8 Анализ на данните 21
2.9 Таргетна и онтологична идентификация 22
III. Резултати 23
1. Въпросници за клинично характеризиране на пациенти в различен стадий на ендометриоза, съобразно ръководството на WERF 23
1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони 23
1.2 Бременност и фертилитет 26
1.3 Болка 27
1.4 Медицинска история 28
1.5 Вредни навици 30
2. Изолиране на ДНК от плазмени проби и създаване на ДНК банка 31
3. Изолиране на РНК от плазмени и тъканни проби и създаване на РНК банка 32

4. Експресионен анализ 34
4.1 МиРНК експресионен профил в плазма 34
4.1.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група. 34
4.1.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група 36
4.1.3 Сравнение между двата стадия 38
4.2 МиРНК експресионен профил в тъкан 40
4.2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група. 40
4.2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група. 41
4.2.2 Сравнение между двата стадия 43
5. Биоинформационен анализ 45
IV. Обсъждане 48
1. Обсъждане на резултатите от клиничното характеризиране на пациентите в различен стадий на ендометриоза 48
1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони 48
1.2 Бременност и фертилитет 49
1.3 Болка 50
1.4 Медицинска история 51
1.5 Вредни навици 53
2. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на миРНК-и в кръвна плазма 53
2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група 57
2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група 58
2.3 Сравнение между двата стадия 60
3. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на тъканни миРНК-и .. 62
4. Заключение и бъдещи насоки 68
V. Изводи 70
VI. Приноси 71
VII. Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд 72
VIII. Благодарности 73
IX. Summary 73

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица

ДИЕ - дълбоко инфилтриращата ендометриоза

ЕМП - епително-мезенхимен преход

иРНК - информационна РНК

кДНК - копи-ДНК

КОК - Комбинираните орални контрацептиви

КТ - компютърна томография

МиРНК, миР – микроРНК

ХСВ - хепатит С вирус

ЯМР - ядрено-магнитен резонанс

Съкращения на латиница

ACOG - American College of Obstetricians and Gynecologists (Американската колегия на акушер-гинеколозите)

AGO - протеин от семейството Argonaute

ASRM - American Society for Reproductive Medicine (Американското дружество по репродуктивна медицина)

CA-125 - cancer antigen-125 (раков антиген-125)

DGCR8 - DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (критичен регион 8 за синдром на ДиДжордж)

EFI - Endometriosis Fertility Index (Фертилен индекс при ендометриоза)

ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейското дружество по човешка репродукция и ембриология)

ER-α - естрогенов рецептор алфа

ER-β - естрогенов рецептор бета

GnRH-a - Аналози на гонадотропин–освобождаващия хормон

GO - Gene Ontology (генна онтология)

GWAS - genome-wide association study (цялостни геномни асоциирани проучвания)

IL - интерлевкин

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Киото енциклопедия на гени и геноми)

LIF - leukemia inhibitory factor (левкемия инхибиращ фактор)

miRISC - miRNA-induced silencing complex (миРНК-индуциран инхибиращ комплекс)

MMP - матриксна металопротеаза

MRE - miRNA response elements (миРНК респонс елемент)

NGS - Next Generation Sequencing (секвениране от ново поколение)

NK-клетки - клетки естествени убийци

PDGFRB - β-type platelet-derived growth factor receptor (произхождащ от тромбоцитите рецептор за растежен фактор тип бета)

PPC – positive PCR controls (позитивните PCR контроли)

qRT-PCR - Real-time quantitative PCR (количествена полимеразно верижна реакция в реално време)

r-ASRM - reverse ASRM (ревизирана класификация на Американското дружество по репродуктивна медицина)

RT-qPCR - количествената полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция

snoRNA – малка ядърцева РНК

snRNA – малка ядрена РНК

SUSD2 - sushi domain containing-2

TNF-α - тумор некрозис фактор-алфа

UTR - untranslated region (нетранслиращия се район)

WES - World Endometriosis Society (Световната общност по ендометриоза)

WERF - World Endometriosis Research Foundation (Световната фондация за проучвания върху ендометриозата)

Въведение

Настоящият дисертационен труд се фокусира върху значим здравен проблем – ендометриозата. Тя засяга 200 милиона жени по света, повлиявайки сериозно техния личен, професионален и социален живот.

Официално болестта се дефинира като развитие на ендометриална тъкан извън маточната кухина. Това кратко определение не дава достатъчно информация за сложния клиничен синдром, включващ естроген-зависима хронична възпалителна реакция, която засяга предимно перитонеалната кухина. Симптомите са вариабилни и неспецифични за болестта, като най-често включват дисменорея, диспареуния, хронична тазова болка и инфертилитет. За момента единственият начин за потвърждаване на диагнозата е лапароскопска операция, последвана от хистологично потвърждаване. Липсата на патогномоничен симптом за ендометриозата и нуждата от оперативна интервенция за диагностицирането ѝ водят до забавяне на диагнозата средно със 7-11 години. Поради това нуждата от неинвазивен биомаркер е все по-осезаема и се превръща в основен приоритет за пациентите, лекуващите лекари и обществото.

Ендометриозата е патология, наблюдавана от векове, а първото ѝ научно описание е направено преди повече от 150 години. Въпреки това, усилията на учените, свързани с откриване на причината за развитието ѝ, все още са безуспешни. Съществуващите към момента теории дават обяснение на част от патологичния процес, но цялостният механизъм на възникването ѝ, все още остава неразгадан.

МикроРНК-ите (миРНК-ите) са къси некодиращи РНК-и, които чрез комплементарно свързване с иРНК инхибират транслацията. По този начин те осъществяват контрол върху генната експресия и следователно имат съществено влияние върху процесите на здраве и болест при човека. МиРНК-ите се откриват както вътреклетъчно, така и в повечето телесни течности, като се отличават с висока стабилност. Те са разглеждани многократно като ключ за разбиране на патофизиологичния механизъм и неинвазивен диагностичен и прогностичен биомаркер за различни патологични състояния, включително рак, автоимунни и гинекологични заболявания.

В научната разработка се включиха пациентки в начален и напреднал стадий на ендометриоза и здрави контроли. За правилната клинична оценка на пациентите се създаде въпросник, който дава възможност за подробно охарактеризиране на пациентките с ендометриоза. Чрез полимеразна верижна реакция в реално време върху миРНК чипове от всеки участник са анализирани два различни вида биологични проби – плазмени и тъканни. МиРНК експресионният анализ даде възможност за детектиране на най-значимите промени между пациентки със и без ендометриоза. Последващите таргетен и онтологичен анализ дадоха подробна информация относно функциите на миРНК-ите с променена експресия.

Данните от анализа на плазмени проби се използваха за идентифициране на миРНК-и с потенциал за неинвазивни диагностични и прогностични биомаркери, а тези от тъканните проби – за проучване на етиопатогенетичните механизми на възникване на ендометриоза.

I. Цел и задачи

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се определят неинвазивни диагностични и прогностични биомаркери за ендометриоза и да се дефинират молекулни пътища, свързани с патогенезата на болестта чрез експресионен анализ на плазмени и ендометриални проби посредством полимеразна верижна реакция в реално време върху миРНК чипове.

Задачи

1. Разработване на въпросник за клинично характеризиране на пациенти в различен стадий на ендометриоза, съобразно ръководството на Световната фондация за проучвания върху ендометриозата.
2. Изолиране на тотална РНК от кръвна плазма и ектопичен ендометриум от пациентки с ендометриоза в различен стадий и от кръвна плазма и еутопичен ендометриум от контролна група и създаване на РНК банка.

3. Изолиране на ДНК от кръвна плазма от пациентки с ендометриоза в различен стадий и от контролна група и създаване на ДНК банка.
4. Изготвяне на сборни РНК проби от кръвна плазма и от ектопичен ендометриум на пациентки в различен стадий на ендометриоза и от кръвна плазма и еутопичен ендометриум от контролна група.
5. Провеждане на миРНК експресионен анализ в проби от кръвна плазма и от ектопичен ендометриум на пациентки в различен стадий на ендометриоза и от кръвна плазма и еутопичен ендометриум от контролна група чрез полимеразна верижна реакция в реално време върху миРНК чипове.
6. Анализ на данните от миРНК експресионниионното профилиране.
7. Таргетен и онтологичен анализ на миРНК-ите със сигнификантна промяна в нивото на експресия.
8. Номиниране на миРНК-и с потенциал за неинвазивни биомаркери за ендометриоза.

II. Материали и методи

---

1. Материали

1.1 Участници в проучването

В изследването са включени 30 пациентки с ендометриоза на възраст между 24 и 46 години и 15 жени без ендометриоза, включени в контролната група, на възраст между 27 и 51 години. Участниците и в двете групи са подбрани от акушер-гинеколози съгласно строги критерии за включване и изключване.

Критерии за включване в пациентската група:

- ✓ лапароскопски потвърдена ендометриоза;
- ✓ класификация според r-ASRM (описана подробно в раздел II, част **Error! Reference source not found.**);
- ✓ попълнен клиничен въпросник.

Критерии за изключване от пациентската група:

- ✓ предишно хормонално лечение за ендометриоза до 3 месеца преди лапароскопията;

- ✓ наличие на придружаващи заболявания (диабет, поликистозни яйчници, гломерулонефрити, хронични инфекции).

В контролната група са включени жени без данни за ендометриоза. При тях се проведе хистероскопия по различни причини – маточни полипи, обилно менструално кръвотечение, тазова болка, диагностично уточняване.

Критерии за включване в контролната група:

- ✓ липса на клинични и ехографски данни за ендометриоза;
- ✓ хистероскопско изследване.

Критерии за изключване от контролната група:

- ✓ лична и фамилна анамнеза за ендометриоза;
- ✓ наличие на придружаващи заболявания (диабет, поликистозни яйчници, гломерулонефрити, автоимунни заболявания, хронични инфекции).

На всички участници, включени в изследването, се предостави Информация за пациента. Всички пациенти подписаха информирано съгласие, изготвено съгласно международните и национални стандарти и одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет-София (КЕНИМУС) (раздел IX, Приложение 2 и 3).

Пациентите в настоящото проучване са подбрани като част от проект „Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез миРНК експресионно профилиране“, № Д-212/12.12.2018 от конкурса „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения - 2018” на Съвета по медицинска наука към Медицински университет-София.

1.2 Биологични проби

За целите на проучването пациентките с ендометриоза са разделени в две групи – начална ендометриоза (която включва пациентките в първи и втори стадий на болестта) и напреднала ендометриоза (пациентките в трети и четвърти стадий на болестта). В Таблица 6 са посочени събраните биологични проби, разделени по групи.

Таблица 1. Събрани биологични проби

Кръвни	Тъканни
15 проби I и II стадий	15 проби I и II стадий

15 проби III и IV стадий	15 проби III и IV стадий
15 контроли	15 контроли

Качеството на миРНК-ите в различните проби може да варира при промяна в условията на средата (337, 338). Все още липсват данни относно конкретните промени, които повлияват на качеството на миРНК-те и механизма, по който това става (104). За избягване на подобни вариабилности, всички проби бяха събирани, обработвани и съхранявани по сходен начин.

1.2.1 Кръвни проби

Вземането на кръвните проби се извърши предоперативно във вакуум-контейнери с ЕДТА от 10 мл при спазване на правилата за стерилност и добра медицинска практика. Контейнерите се надписаха с датата и часа на пробовземането и кода на пациентката. Транспортирането до Катедрата по Медицинска генетика се осъществи в рамките на 15 мин от взимането на материала.

При достатъчно количество на кръвната проба от нея се отделиха 5 мл за екстракция на ДНК чрез фенол-хролороформна екстракция. От оставащите 5 мл, след центрофугиране, плазмата се раздели на аликвоти от 300µл. Епруветките се етикираха с кода на пациента и датата на сепариране на плазмата и се замразяват на -80^{O}C и съхраняват до изолирането на РНК.

1.2.2 Тъканни проби

Тъканните проби (минимум 1г) са взети при лапароскопия/хистероскопия в стерилни контейнери при спазване на правилата за стерилност и добра медицинска практика. Контейнерите се надписаха с датата и часа на пробовземането и кода на пациента. Транспортирането до Катедрата по Медицинска генетика се осъществи в рамките на 15 мин от взимането на материала. В рамките на 15 мин след доставянето на материала от него се отдели малко количество, към което се добави РНК-стабилизиращ агент.

Частта от пробата, съдържаща РНК стабилизиращ агент, се съхранява на -20^{o}C до изолиране на РНК. Останалата част се съхранява замразена във фризер на -80^{o}C.

2. Методи

2.1 Клиничен въпросник

Въпросникът на Световната фондация за проучвания върху ендометриозата (World Endometriosis Research Foundation, WERF), насочен към пациентки с ендометриоза, който цели детайлното им охарактеризиране и събиране на клинично релевантните данни, се адаптира и преведе на български език (раздел IX, Приложение 1). Клиничният въпросник се предостави за попълване на всяка пациентка с лапароскопски потвърдена ендометриоза. Възникнали въпроси в хода на попълването му се изясняват от акушер-гинеколог.

2.2 Изолиране на ДНК и РНК от кръвните проби

От събраните 45 кръвни проби се извърши изолиране на тотална РНК от плазма чрез кита на Qiagen® miRNeasy Serum/Plasma Kit и използване на miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (Qiagen®). Последният осигурява идентифициране и минимизиране на вариациите при изолиране на циркулиращи РНКи чрез включване на синтетична РНК секвенция към пробата (339). Spike-In Control се добавя по време на процеса на пурификация след хомогенизиране с лизис реагента. Тази стъпка осигурява нормализиране на всички неспецифични загуби, които могат да възникнат по време на РНК пурификацията.

2.1.1 Техника на изолиране на РНК

- Размразяване на пробата от кръвна плазма до достигане на стайна температура (15-20°C);
- Добавяне на 1000 µL лизиращ реагент - QIAzol Lysis Reagent;
- Инкубиране на пробите на стайна температура (15-20°C) за 5 минути;
- Добавяне на 3,5 µL реагент за контрол на качеството и количеството на изолираната РНК - miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control ($1{,}6 \times 10^8$ copies/µL);
- Добавяне на 200 µL хлороформ;
- Инкубиране на пробите на стайна температура (15-20°C) за 2-3 минути;
- Центрофугиране за 15 минути 12000 об./мин на температура 4°C;
- Отделяне в стерилна, несъдържаща нуклеази, епруветка тип Епендорф на 600 µL от надлежащата фаза;

- Към отделената 600 µL надлежаща фаза в епруветка тип Епендорф се добавя 100% етанол в обем 900 µL и сместа се разбърква с помощта на пипета;
- Отпипетиране на 700 µL от хомогенизираната смес в предварително подготвената (налична в кита) центрофужна колонка - RNeasy MinElute Spin Column;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстраняване на проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Пипетиране на останалите около 700 µL от пробата в празната центрофужна колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстраняване на проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 700 µL на буфер – buffer RWT в центрофужната колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстраняване на проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 500 µL на буфер – buffer RPE в центрофужната колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстраняване на проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 500 µL 80% етанол в центрофужната колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 2 минути при стайна температура (15-20°C) за промиване на центрофужната колонка;
- Прехвърляне на центрофужната колонка в чиста колекторна епруветка (налична в кита);
- Центрофугиране при 14000 об./мин за 5 минути при стайна температура (15-20°C) с отворени капачки на епруветките за изсушаване на центрофужната мембрана;

- Прехвърляне на центрофужната колонка в чиста центрофужна епруветка тип Епендорф (налична в кита);
- Добавяне на 14 µL RNAse-Free Water в центъра на центрофужната мембрана;
- Внимателно затваряне на капачките;
- Центрофугиране при 14000 об./мин за 1 минута при стайна температура (15-20°C) за елуиране на РНК от центрофужната мембрана в елуиращия разтвор.

Изолираната РНК се замрази при температура -80°C и се съхранява до следващия етап от изследването. На Фигура 2 е показан част от процеса по изолиране на РНК от плазмените проби.

Изолирането на геномна ДНК се извърши от 38 проби чрез фенол-хлороформна екстракция. Редуцираният брой ДНК проби се дължи на малкото количество кръв, взета от някои от пациентките и приоритетното й използване за изолиране на РНК.

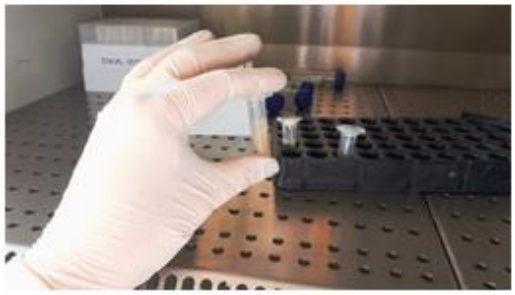
2.1.2 Техника на изолиране на ДНК

- Прехвърляне на кръвната проба в 15 mL центрофужна епруветка;
- Добавяне на 10 mL студен (2-5°C) 1x Lysis buffer (pH 7,4) и механично хомогенизиране на разтвора;
- Инкубиране на пробите на температура 0°C (ледена баня) за 30 минути;
- Центрофугиране за 10 минути при 3500 об./мин, температура 4°C и последващо отстраняване на супернатантата;
- Хомогенизиране на разтвора с помощта на пипета тип „Пастьор“;
- Центрофугиране за 10 минути при 3500 об./мин, температура 4°C и последващо отстраняване на супернатантата;
- Добавяне на 2 mL 1x SE buffer (pH 8,0) и хомогенизиране на разтвора с помощта на пипета тип „Пастьор“;
- Добавяне на 200 µL 10% SDS разтвор и на 35 µL 20 mg/mL разтвор на Протеиназа К;
- Инкубиране на пробите на температура 37°C за 24 часа;
- Добавяне на еквивалентен обем фенол, еквилибриран с 0,5M Tris-Cl buffer (pH 8,0);
- Хомогенизиране на разтвора с помощта на пипета тип „Пастьор“ и вортексиране на ниски обороти;

- Центрофугиране за 10 минути при 3500 об./мин на стайна температура и последващо прехвърляне на супернатантата в чиста 15 mL центрофужна епруветка;
- Добавяне на еквивалентен обем разтвор на фенол, хлороформ и изоамилов алкохол (25:24:1), хомогенизиране на разтвора с помощта на пипета тип „Пастьор“ и вортексиране на ниски обороти;
- Центрофугиране за 10 минути при 3500 об./мин на стайна температура и последващо прехвърляне на супернатантата в чиста 15 mL центрофужна епруветка;
- Добавяне на еквивалентен обем разтвор на хлороформ и изоамилов алкохол (24:1) и хомогенизиране на разтвора с помощта на пипета тип „Пастьор“, вортексиране на ниски обороти;
- Центрофугиране за 10 минути при 3500 об./мин на стайна температура и последващо внимателно прехвърляне на супернатантата в чиста 15 mL центрофужна епруветка;
- Добавяне на 3 еквивалентни обема ледено студен (-20°C) абсолютен етанол, механично хомогенизиране;
- Изваждане на преципитиралата ДНК с помощта на U-образна стъклена пръчка;
- Промиване на преципитиралата ДНК в 70% разтвор на етанол;
- Разтваряне на преципитиралата ДНК в 500-1000 µL стерилен TE buffer (pH 8,0);
- Инкубиране на пробите на въртяща платформа на стайна температура за 12-24 часа;
- Съхраняване на изолираната ДНК на –20ºC.

За качествен и количествен контрол на изолираната РНК и ДНК се използва спектрофотометричен метод за измерване на абсорбцията на монохроматична светлина с дължини на вълната 260 и 280 nm. Измерването се извърши на апарат Fisher Thermo Scientific® Nanodrop 2000c.

А)



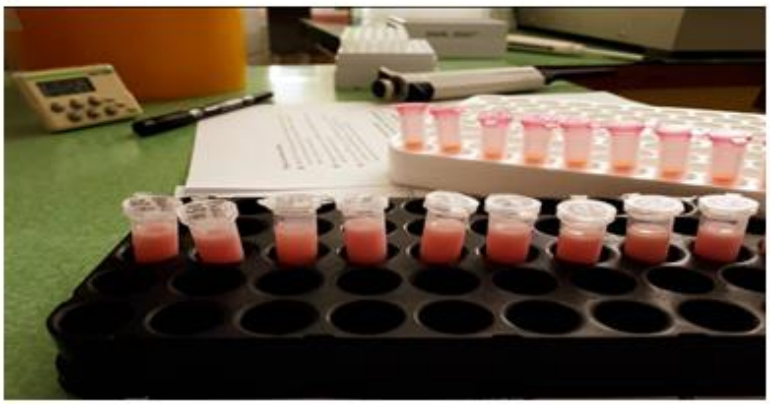
Г)



Б)



В)



Фигура 1. Изолиране на РНК от плазма. А) Размразяване на плазмените проби, Б) Реактиви за изолиране на РНК от плазма, В) Стъпка от процеса на изолиране на РНК, Г) Количествен и качествен контрол на изолираната РНК на апарат Fisher Thermo Scientific® Nanodrop 2000c

2.2 Изолиране на РНК от тъканните проби

От събраните тъканни проби от 15-те пациенти в ранен стадий на ендометриоза, 15-те пациенти в късен стадий и от 15-те контроли се изолира РНК чрез кит на Qiagen® miRNeasy MiniKit. Според инструкциите на производителя от всяка тъканна проба се отдели количество от 30 мг за екстракция на РНК.

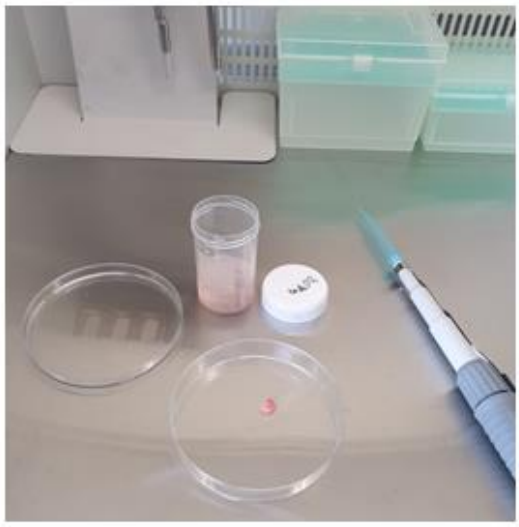
Техника за изолиране на РНК:

- Измереното количество тъкан се отделя от стабилизиращия агент и се поставя в петри, където се накълцва с помощта на скалпел на малки частици;
- Раздробената тъканна проба се поставя в епруветка тип Епендорф 1,5 mL и към нея се добавя 600µl Buffer RLT. Към него предварително се добавя 10µl/1ml β-меркаптоетанол;
- С помощта на спринцовка (2cc) и игла (20G) получената смес се хомогенизира;
- Лизатът се центрофугира за 3мин на 12000 об./мин;
- Внимателно се отделя супернатантата в нова епруветка тип Епендорф;
- Към пробата се добавя равен обем от 70% етанол (600µl) и се вортексира;
- 700µl от пробата се прехвърля в RNeasy Spin Column (2ml);
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстранява се проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Пипетиране на останалото количество от пробата в празната центрофужна колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстранява се проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 700 µL на буфер – buffer RW1 в центрофужната колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстранява се проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 500 µL на буфер – buffer RPE в центрофужната колонка;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 15 секунди при стайна температура (15-20°C);
- Отстранява се проточната течност от колекторната епруветка на центрофужната колонка;
- Добавяне на 500 µL на буфер – buffer RPE в центрофужната колонка;

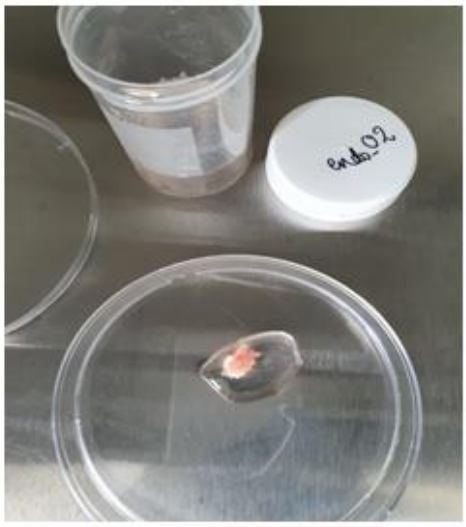
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 2 минути при стайна температура (15-20°C) за промиване на мембраната на колонката;
- Колонката се поставя в чиста колекторна епруветка (2ml);
- Центрофугиране за 1мин на 12000об/мин за елиминиране на възможни остатъци от буфера;
- Прехвърляне на центрофужната колонка в чиста колекторна епруветка (налична в кита);
- Добавя се 30-50 RNAse-Free Water в центъра на центрофужната мембрана;
- Центрофугиране при 8000 об./мин за 1 минута при стайна температура (15-20°C) за елуиране на РНК от центрофужната мембрана в елуиращия разтвор.
- Съхраняване на изолираната РНК при температура -80°C.

На Фигура 3 е показан част от процеса по изолиране на РНК от тъканните проби.

А)



Б)



В)



Г)



Фигура 2. Изолиране на РНК от тъкан. А) и Б) Отделяне на тъканта от стабилизиращия агент и подготовка за процеса на накълцване, В) Реактиви за изолиране на РНК от тъкан, Г) Зареждане на центрофугата

2.3 Създаване на РНК биобанка

Получените РНК проби, изолирани от кръв и тъкан са кодирани, описани и съхранени на -80ºС. Качеството и количеството на РНК са оценени по протокол на производителя и записвани в електронното досие на пациента. Всички данни са въведени в разработена налична база данни на пациентите и контролите.

2.4 Създаване на ДНК биобанка

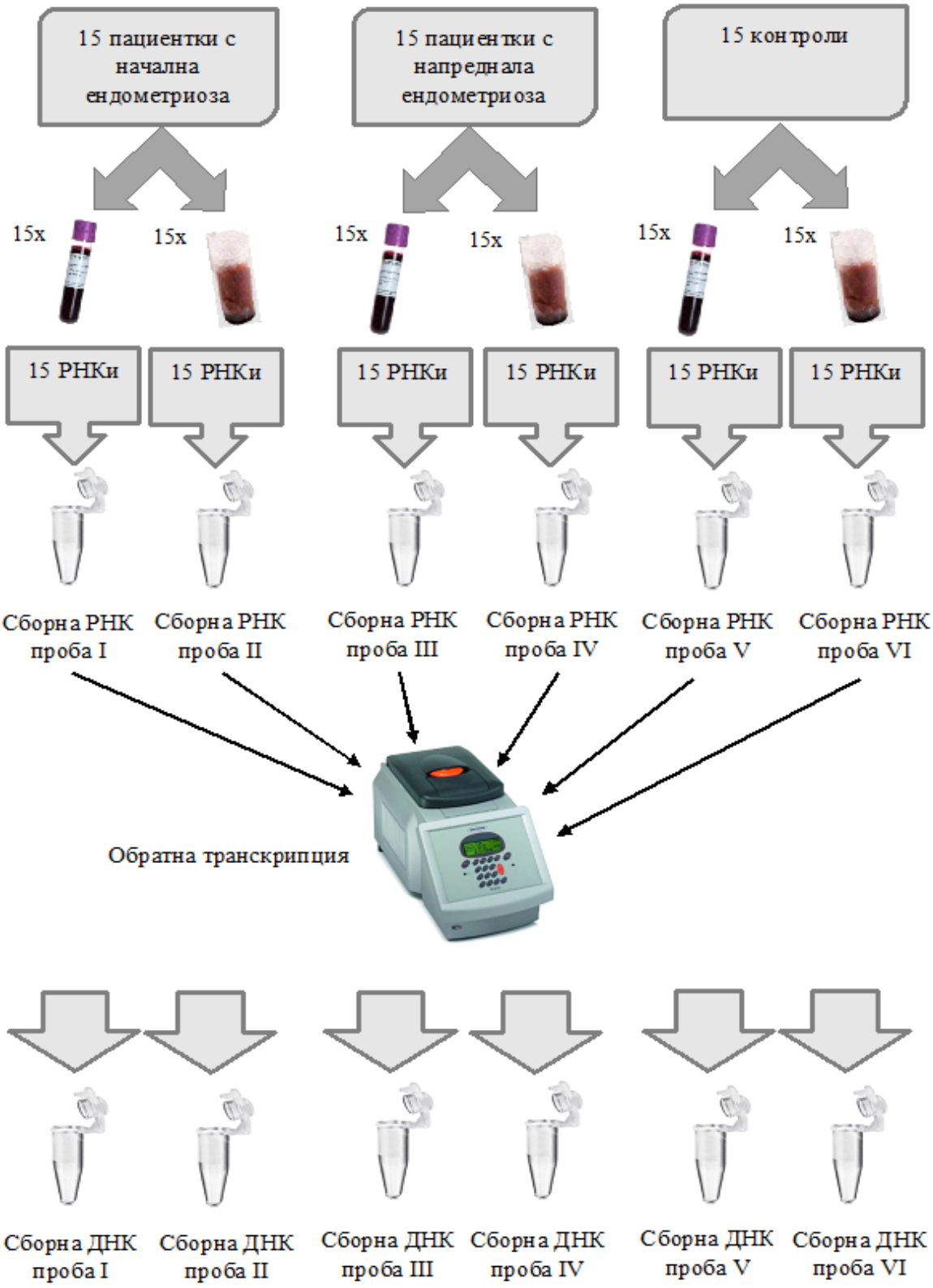
Получените ДНК-проби, изолирани от кръв са кодирани, описани и съхранени на -20ºС. Качеството и количеството на ДНК са записвани в електронно досие на пациента. Всички данни са въведени в разработена налична база данни на пациентите и контролите.

2.5 Формиране на клинични групи и сборни проби

Плазмените проби са разделени в три групи и съответно се изготвиха три сборни проби: 1) ендометриоза в първи и втори стадий, 2) ендометриоза в трети и четвърти стадий и 3) контроли. Еднакви концентрации от всяка пациентска/контролна РНК проба се смесват в обща сборна РНК проба.

Тъканните проби също са групирани в три групи и съответно се изготвиха три сборни проби: 1) ендометриоза в първи и втори стадий, 2) ендометриоза в трети и четвърти стадий и 3) контроли. Еднакви концентрации от всяка пациентска/контролна РНК проба, се смесват в обща сборна РНК проба.

Общо са съставиха шест сборни РНК проби, които се подложиха на последващи анализи (Фигура 4).



Фигура 3. Дизайн на проучването от набирането на пациенти до етапа преди експресионния анализ

2.6 Обратна транскрипция на сборните проби

Шестте сборни РНК проби се подложиха на обратна транскрипция. Процесът по превръщане от РНК в копиДНК (кДНК) се осъществи с кита miScript II RT kit.

Апаратът, на който се извърши процеса е Techne TC-414 Thermal Cycler. MiScript PCR системата на Qiagen® използва като изходен материал тотална РНК, съдържаща миРНК, за синтез на кДНК. Уникалната формула на използвания в реакцията HiSpec буфер осигурява селективно превръщане на зрели миРНКи и други къси РНКи в кДНК. Освен това, той потиска преобразуването на дългите РНКи, в резултат, на което фоновите сигнали, дължащи се потенциално на тях, се минимизират. Зрелите миРНКи се полиаденилират от поли(А) полимераза и се подлагат на обратна транскрипция с помощта на олигодеокситиминови праймери (олиго-дТ). Чрез модифициране на 3`- и 5`-краищата на миРНКите, олиго-дТ праймерите осигуряват селективното им амплифициране в последващия процес.

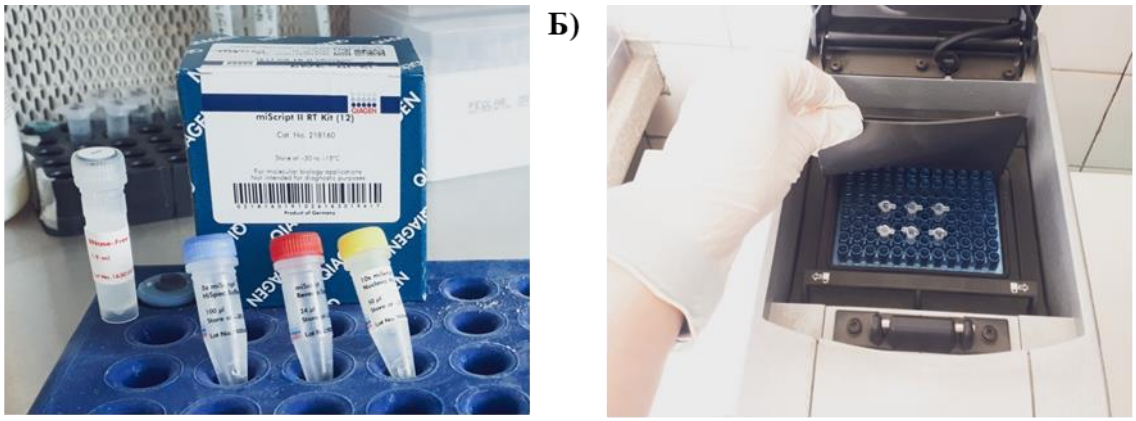
За извършването на реакцията от всяка сборна РНК проба се използва обем от 10 µL.

Процес на превръщане на РНК в кДНК:

- Размразяване на РНК пробата „на лед“;
- Размразяване на необходимите реактиви - RNAse-Free Water, MiScript Reverse Transcription mix, 10x MiScript Nucleic Mix, 5x MiScript HiSpec buffer до достигане на стайна температура (15-20°C);
- Приготвяне на епруветката за реакционната смес „на лед“ (описаните количества са за една проба):
  - Добавяне на 4 µL 5x MiScript HiSpec buffer разтвора;
  - Добавяне на 2 µL 10x MiScript Nucleic Mix;
  - Добавяне на 3 µL RNAse-Free Water;
  - Добавяне на 2 µL MiScript Reverse Transcription mix.
- Добавяне на 11 µL от реакционната смес в стерилна, несъдържаща нуклеази, епруветка за PCR 0,2 ml;
- Пипетиране на 9 µL от съответната сборна проба в епруветката с реакционната смес;
- Инкубиране на пробите на температура 37°C за 60 минути;
- Инкубиране на пробите на температура 95°C за 5 минути за инактивиране на реакцията на обратна транскрипция;
- Замразяване на получената стабилна кДНК проба за съхранение на -20°C.

На Фигура 5 е представен снимков материал от процеса по обръщане на РНК пробите в кДНК.

А) Б)



Фигура 4. Обратна транскрипция на сборните проби. А) Реактиви „на лед“, Б) Подреждане на пробите в PCR апарата.

2.7 Експресионен анализ на зрели миРНК

Методът на полимеразната верижна реакция в реално време (RT-PCR) върху миРНК чипове позволява едновременно да се анализира експресията на 84 миРНКи. Технологията комбинира възможностите на количествения PCR в реално време (qRT-PCR) със способността на чиповете за едновременен анализ на множество последователности.

PCR методът е сред най-мощните средства на молекулярната биология. При традиционната PCR реакция детекцията и количественото определяне на амплифицираната секвенция се случва след последния PCR цикъл и включва постреакционен анализ. При количествения PCR в реално време количеството получен продукт се детектира индиректно по време на всеки цикъл на реакцията, като се следи количеството на флуоресцентно белязана сонда. По този начин се отчита броят цикли (Ct), необходими за получаване на определен брой ДНК молекули. По време на PCR реакцията количеството на ДНК молекулите се удвоява при всеки амплификационен цикъл, като това дава възможност да се определи първоначалният брой ДНК молекули, които съдържат таргетната секвенция. Колкото по-голямо е изходното количество на нуклеиновата киселина, толкова по-бързо ще се наблюдава нарастване на интензитета на флуоресценцията. Съвременното оборудване и оптимизиран анализ позволяват определяне на количеството ДНК молекули в дадена проба, които съдържат търсената секвенция, с точност до единична молекула.

Детекцията на PCR продуктите се осъществяви по механизма SYBR Green I химизъм. При SYBR Green I химизмът се използва SYBR Green I багрило, което

е високо специфично и свързва двойноверижна ДНК. На основата на този принцип се прави детекция на натрупания PCR продукт. SYBR Green I отчита всички двойноверижни ДНК, включително и неспецифични продукти на реакцията.

Относителната оценка на генната експресия позволява анализ на промените на генната експресия в дадена проба в сравнение с референтна проба. За тази цел най-често се прилага 2-$_{\Delta\Delta}$Ct методът (относителен анализ). Той дава информация за разликата в нивата на експресия между две проби и се изчислява чрез следните уравнения:

$_{\Delta}$Ct проба = Ct прицелен ген – Ct ендогенна контрола

$_{\Delta}$Ct контрола= Ct прицелен ген – Ct ендогенна контрола

$_{\Delta}$Ct проба - $_{\Delta}$Ct контрола = $_{\Delta\Delta}$Ct = 2(-$_{\Delta\Delta}$Ct)

Едно от предизвикателствата при миРНК експресионното профилиране е липсата на установени гени с постоянна експресия в клетките (*housekeeping)* за нормализиране на данните при използване на $_{\Delta\Delta}$Ct метода. Възприетият подход в такива случаи е използване на малки некодиращи РНКи – малки ядрени (snRNAs) и малки ядърцеви (snoRNAs), които нормализират данните от миРНК експресията по същия начин, по който *housekeeping* гените нормализират данни от иРНК експресия (339). Голяма част от snRNAs и snoRNAs имат постоянна експресията без значими вариации между различните клетъчни видове.

$_{\Delta}$Ct стойността на всяка зряла миРНК в плаката е изчислена според формулата:

$$_{\Delta}Ct = AVG\ Ct^{миРНК} – AVG\ Ct^{SN1/2/3/4/5/}$$

$_{\Delta\Delta}$Ct за всяка миРНК от двете miScript miRNA PCR плаки е изчислена според формулата:

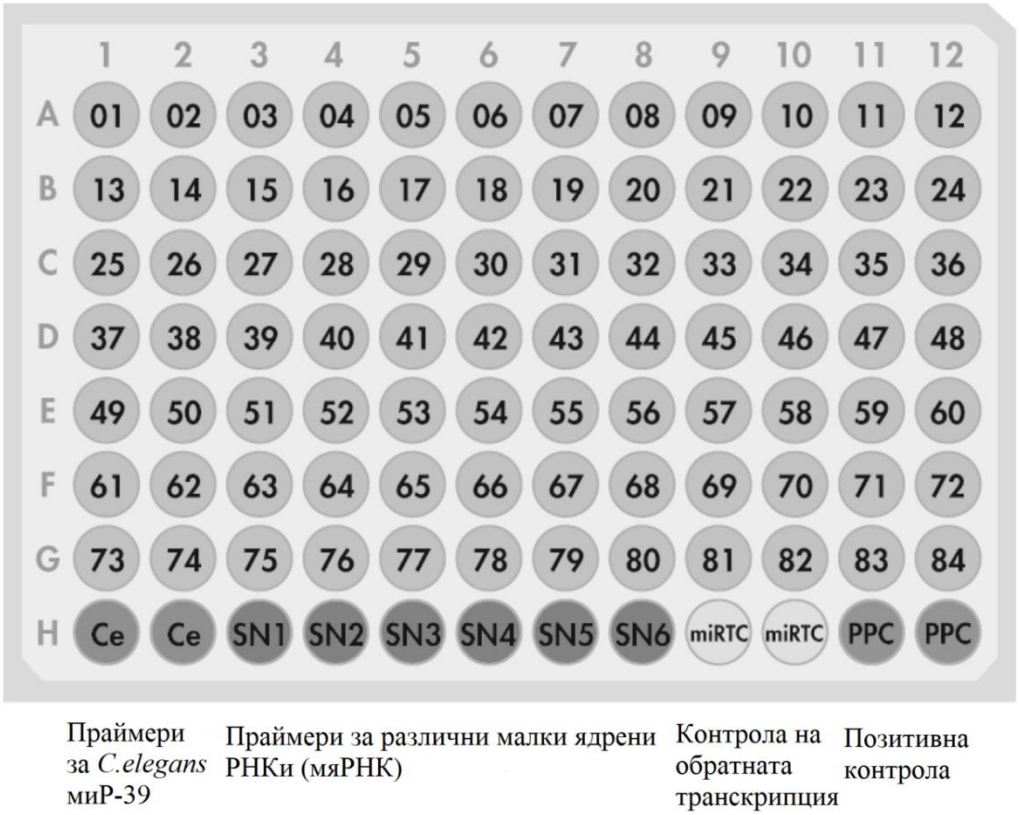
$$_{\Delta\Delta}Ct = {}_{\Delta}Ct^{\text{контролна проба}} – {}_{\Delta}Ct^{\text{пациентска проба}}$$

N-кратната промяна в експресията за всяка миРНК от пациентските и контролните проби е изчислена като 2(-$_{\Delta\Delta}$Ct).

Стандартният qRT-PCR метод позволява анализ на единични гени (миРНКи), което би затруднило изследването на голям брой миРНКи. Това налага използването на PCR чип технологията, при която се елиминира този недостатък. Тя е базирана на SYBR Green I химизма и е идеалното средство за анализ на експресията на панел от миРНКи.

МиРНК PCR чиповете се характеризират с висока чувствителност и специфичност, бързина, добра възпроизводимост и надеждност на получените

резултати. Всяка от плаките съдържа панел от 96 праймера, подредени в отделни ямки (Фиг. 6). В ямки от A1 до G12 са разположени 84 праймера за амплификация на зрели миРНКи (списък на миРНКите, които влизат в двата вида използвани плаки, е представен в раздел X, Приложения 4 и 5. В ямки H1 и H2 са разположени праймери за миР-39 на *C.elegans*, а в H3-H8 - праймери за различни малки ядрени РНК (SN1=SNORD61, SN2=SNORD68, SN3=SNORD72, SN4=SNORD95, SN5=SNORD96A, SN6=RNU6B/RNU6-2). Всички те служат като контроли за нормализация на реакцията. Ямки H9 и H10 са определени за контроли за обратната транскрипция. Ct стойностите на контролата на обратна транскрипция се изследва чрез стойностите на позитивните PCR контроли (PPC). $\Delta Ct = AVG\ Ct^{miRTC} - AVG\ Ct^{PPC}$. При стойности <7 няма инхибиция на обратната транскрипция и реакцията е протекла нормално. H11 и H12 са ямки за PPC. Ако РНК пробата е с добро качество, PCR реакцията протече нормално и праговата стойност е дефинирана коректно, $_{\Delta}Ct^{PPC}$ трябва да бъде 19±2 за всички плаки.



Фигура 5. Дизайн на 96-ямковата плаката за експресионен анализ

2.7.1 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от RT-PCR върху миРНК чипове

За експресионния анализ на миРНКи беше използван 96-ямков Human Serum & Plasma miRNA PCR Array (Qiagen®). Този чип се използва за търсене на

промени в експресията на специално подбран панел миРНКи (Приложение 4), доказано водещи до дерегулация на основни биологични пътища при различни патофизиологични процеси.

- Към всяка сборна проба кДНК се добавя 200 µL RNAse-Free Water;
- Размразяват се реагентите и се прави реакционна смес в пропорции, показани в Таблица 7.

Таблица 2. Пропорции на реакционната смес

2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µL
10x miScript Universal Primer	275 µL
RNAse-Free water	1000 µL
Template cDNA	100µL
Total volume	2750µL

- Към всяка ямка на Serum & Plasma miRNA PCR Array на лед се добавя реакционна смес в количество от 25 µL;
- Стъпките и условията на провеждане на RT-PCR реакцията са показани в Таблица 8.

Таблица 3. Условия на RT-PCR реакцията

Стъпка	Време	Температура	
Първоначален цикъл	15 мин	95^{O}C	
3-стъпков цикъл:			
Денатурация	15 сек	94 ^{O}C	
Снаждане	30сек	55^{O}C	
Елонгация	30 сек	70^{O}C	Събиране на данните за експресията
Брой цикли	40		

2.7.2 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от тъкан с RT-PCR върху миРНК чипове

За експресионния анализ на миРНКи беше използван 96-ямков Human miFinder miRNA PCR Array (Qiagen®). Той включва панел от миРНКи, подбрани въз

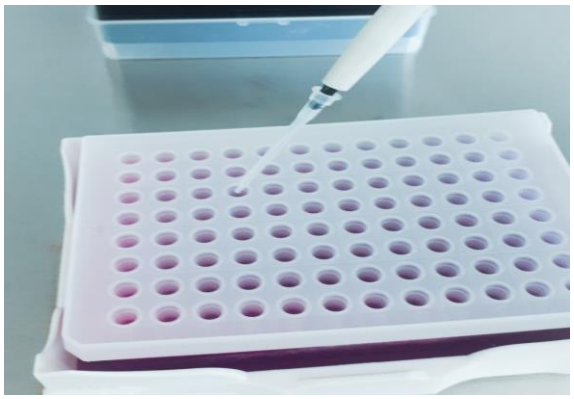
основа на резултатите, публикувани в рецензирани списания, които показват корелация между серумните им нива на експресия и широк панел от заболявания.

- Реакционната смес се приготвя по същия механизъм със същите пропорции на реагентите, както описаните по-горе;
- Към всяка ямка на Human miFinder miRNA PCR Array на лед се добавя реакционна смес в количество от 25 µL;
- RT-PCR реакцията протича при същите условия, както описаните по-горе.

Апаратът, на който извърши експресионния анализ на тъканните и на плазмените проби, е RT-PCR Applied Biosystems модел 7500. Той позволява работа с 96-ямкови плаки за едновременно анализиране на експресията на 84 миРНКи.

Applied Biosystems 7500 изисква задаване на базова линия и на прагови стойности. Базовата линия представлява нивото на шум в ранните цикли, където няма забележимо увеличение на флуоресценцията от PCR продуктите. Според препоръките на производителя тя трябва да постави след 2-ри и преди 15-ти цикъл. Апаратът изисква мануална настройка на прага Ct стойностите, който е по-нисък, отколкото при други подобни инструменти. Според препоръка на производителя беше избрана прагова стойност от 0.02 (Фиг. 7).

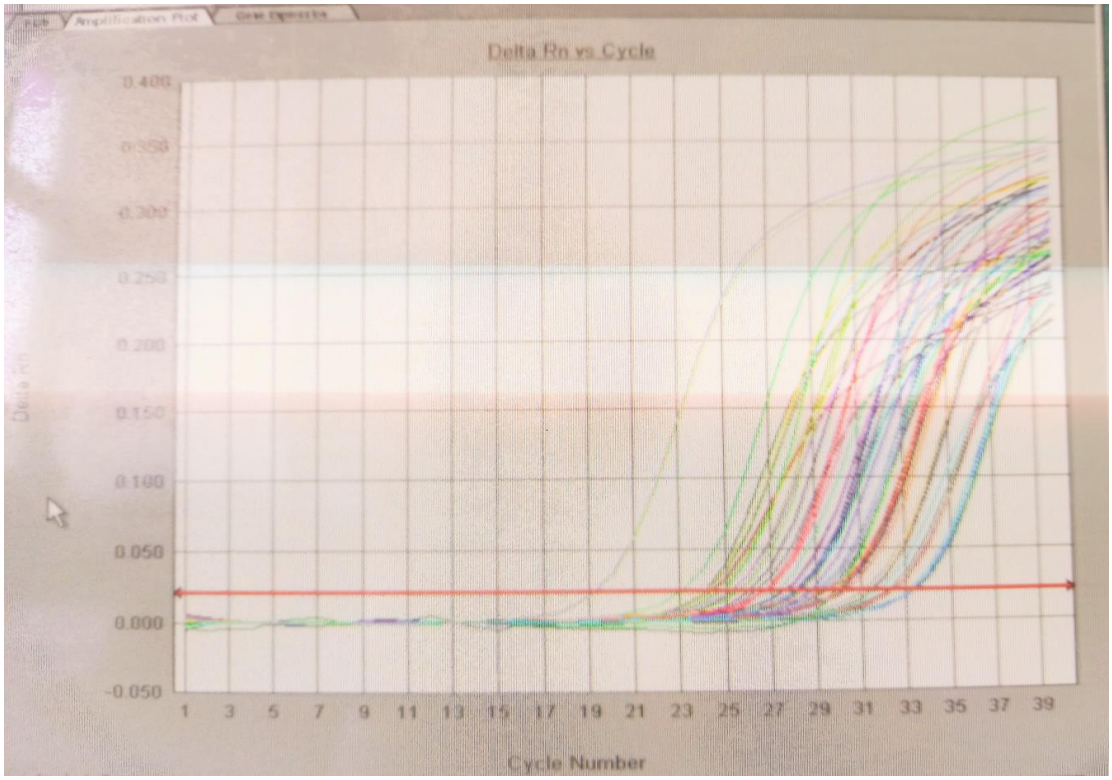
А)



Б)



В)



Фигура 6. МиРНК експресионен анализ. А) Добавяне на реакционната смес на лед във всяка ямка, Б) Реактиви за приготвяне на реакционната смес, В) Real-time PCR криви.

2.8 Анализ на данните

След завършване на PCR реакцията Ct стойностите се експортираха в съответствие с ръководството на апарата. Последващият анализ се извърши чрез специално създадена за целта софтуерна програма, предоставена от Центъра за анализ на данни GeneGlobe (GeneGlobe Data Analysis Center) на Qiagen. GeneGlobe е уеб ресурс за анализ на данни от изследвания с RT-PCR или NGS. Модулът за данни от RT-PCR е базиран на електронна таблица, която изисква спецификация на използвания артикул, параметрите на реакцията и

експортираните данни от PCR апарата. След това алгоритъмът сравнява данните от случаите и контролите като трансформира Ct стойностите в изчислени резултати за експресията на миРНК-и.

2.9 Таргетна и онтологична идентификация

Откриването на миРНК-ите и доказването на тяхната функция като регулатори на генната експресия естествено води след себе си интерес към откриването на техните иРНК таргети (252). Някои от методите, използвани за таргетна идентификация, са описани в раздел II, част **Error! Reference source not found.**.

За идентификация на миРНК-ите с детектирана променена експресия бяха използвани онлайн бази данни. Към настоящия момент такива бази данни предоставят информация за миРНК експресия, секвенция, валидирани иРНК таргети и техните секвенции, локализация в генома и нивото на експресия в различни тъкани (340). Алгоритмите им дават възможност за настройки от страна на потребителя в зависимост от спецификите на експеримента (252). Всички тези алгоритми са експериментално валидирани. За целите на нашия експеримент са използвани базите данни DIANA-TarBase, TargetScan и PicTar (341-343).

Генно онтологичната (Gene Ontology, GO) класификация представлява база данни, съдържаща актуалната информация за функцията на гените и по-специално на белтъците и некодиращите миРНК-и, кодирани от тях (344, 345). GO характеризира информацията в три основни направления: молекулярна функция, клетъчен компонент и биологичен процес. Киото енциклопедия на гени и геноми (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) е колекция от бази данни, която предоставя информация за високоспециализирани функции на биологичните системи на база на мащабни молекулярни проучвания (346). KEGG пътищата обединяват определен набор от гени, които взаимодействат помежду си, за да реализират биологичната си функция. GeneCodis е уеб-базиран ресурс за онтологичен анализ на гени, протеини, миРНК-и, транскрипционни фактори и CpG повтори, който позволява определяне на биологичната анотация на търсените молекули (347). Освен единични анотации, този ресурс позволява потребителят едновременно да оцени анотациите от различни източници, например GO биологичен процес и KEGG

пътища. Биологичната функция на отделните миРНКи, както и комбинираният ефект на няколко миРНК-и, се определиха чрез провеждане на обогатителен анализ на KEGG пътищата с използването на уеб-ресурса GeneCodis.

III. Резултати

1. Въпросници за клинично характеризиране на пациенти в различен стадий на ендометриоза, съобразно ръководството на WERF

Многогодишните проучвания върху ендометриозата показват, че придържането към стандартни оперативни протоколи за набиране, обработка и съхранение на биологичните проби, както и коректното класифициране на болестта по време на оперативни интервенции, не е достатъчно за стандартизиране на изследванията от различните научни групи. През 2013-та година започва активна работа по проекта на WERF, целящ хирургично клинично и епидемиологично фенотипизиране (феном) на пациентките с ендометриоза (348). Целта на проекта е да се създадат препоръки, базирани на доказателства, които да подпомогнат международни колаборации и дългосрочни проучвания, които се основават на търсенето на биомаркери и терапии за ендометриоза (348). Това е уникална инициатива, целяща унифициране на методите на работа за повече и по-добри резултати от бъдещите научни разработки.

Оригиналният въпросник на WERF има две разновидности – стандартен и съкратен вариант, като последният съдържа въпроси, разпределени в шест секции. Познавайки характеристиките на пациентките, взели участие в този дисертационен труд, беше преценено, че нито един от двата варианта не би бил удачен за приложение. По тази причина въпросникът беше преработен и адаптиран с цел да бъде добре разбран от участниците и да се осигури коректното му попълване.

1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони

Резултатите от първия разгледан показател показват, че към момента на попълване на въпросника 50% (n=15) от пациентките са били на възраст между 30 и 39 години, 37% (n=11) – на 20-29 години и 13% (n=4) – на 40-49 години.

Средната възраст на пациентките е 35±9 години за ранните стадии (варира между 26 и 44) и 35±11 години за късните стадии (варира между 24 и 46) на болестта (Табл. 9). В контролната група възрастта е по-висока – средно 39±12 години, като варира в интервала между 27 и 51. Разпределението е както следва: 13% (n=2) са във възрастовата група 20-29 години, 27% (n=4) - 30-39 годни, 53% (n=8) - 40-49 години и 7% (n=1) – 50-51 години.

По отношение на характеристиките на менструалния цикъл не се откриват значими разлики между двете групи пациенти, както и между пациенти и контроли (Табл. 9). Средната възраст на настъпване на менархе при всички е 13 години, а вариабилностите в минималната и максималната възраст са пренебрежимо малки.

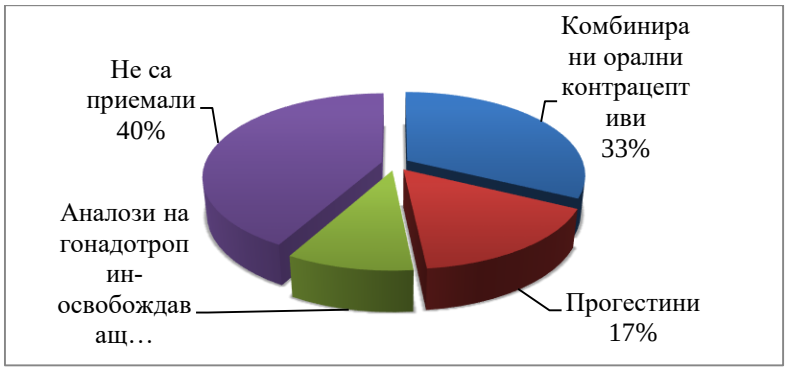
Мнозинството от участничките съобщават, че месечният им цикъл е редовен. Броят менструации за последната година при всички е 12 и при всички такава е настъпила в последните три месеца. В групата на ранната ендометриоза при една пациентка е докладвано закъснение в рамките на 3-7 дни, а в групата на късната ендометриоза също при една пациентка има закъснение от 8 до 20 дни. Всички пациентки с изключение на една имат спонтанно настъпващо менструално течение. При нея е било необходимо хормонално индуциране за различни периоди от време. Продължителността на менструалното течение също не се различава между отделните групи – средно продължава шест дни.

Таблица 4. Данни за възраст и характеристики на менструалния цикъл в трите групи участници

Показател	Пациенти		Контроли
	Стадий I-II	Стадий III-IV	
Възраст:			
- **средна**	**35**	**35**	**39**
- **максимална**	**44**	**46**	**51**
- **минимална**	**26**	**24**	**27**
Възраст на менархе:			
- **средна**	**13**	**13**	**13**
- **максимална**	**14**	**15**	**15**
- **минимална**	**10**	**12**	**11**

Брой менструации за последната година	**12**	**12**	**12**
Наличие на менструация през последните 3 месеца	**100%**	**100%**	**100%**
Редовна менструация	**93%**	**93%**	**80%**
Продължителност на менструално течение:			
- **средна**	**6**	**6**	**6**
- **максимална**	**7**	**7**	**7**
- **минимална**	**5**	**5**	**4**

Всички пациентки бяха помолени да изброят хормони, които са използвали през различни периоди от живота си, независимо от причината за това – нерегулярен менструален цикъл, контрацепция, ендометриоза, подготовка за операция и др. Резултатите показват, че 60% (n=18) са приемали някакъв хормонален препарат (Фиг. 8). Най-често използвани са оралните контрацептиви в различни хормонални комбинации (етинилестрадиол и гестоден, етинилестрадиол и дроспиренон, етинилестрадиол и ципротеронов ацетат) поради нередовна менструация, кисти на яйчника или предоперативна подготовка. Те са приемани за различен период от време – между четири дни и четири години от 33% (n=10) от жените в пациентските групи. Прогестини (норетистерон, линестренол, дидрогестерон) са употребявани от 17% (n=5) от жените с ендометриоза. Продължителността на прием варира между еднократен и една година. Процентът на пациентките, лекувани с GnRH-а (гозерелин), е 10% (n=3). Не се откриват разлики при жените в различните стадии на болестта. Нито една пациентка не споменава да е използвала вътрематочна спирала.



Фигура 7. Процентно разпределение на приеманите хормонални препарати от жените в пациентската група

1.2 Бременност и фертилитет

От групата на пациентите бременност са имали 33% (n=10), като 70% (n=7) от тях са в ранен стадий на ендометриоза, а 30% (n=3) – в напреднал. В повечето случаи бременността е настъпила спонтанно, с изключение на една пациентка в напреднал стадий на болестта, която е забременяла с помощта на методи на асистирана репродукция. При жените в стадий I-II има седем бременности, завършили с раждане на здрави деца, един спонтанен аборт и един аборт по желание. В другата група пациенти, в стадий III-IV, изходът от всички бременности е раждане на здрави деца. При контролите има 15 живородени деца и два спонтанни аборта.

Трудности при забременяване, дефинирани като липса на забременяване след шест месеца редовни опити за зачеване, са съобщени от 13% (n=2) от жените в ранен стадий и 20% (n=3) от жените в напреднал стадий на ендометриоза. В първата група бременност е постигната спонтанно при една от пациентките, а във втората група – чрез методи на асистирана репродукция също при една от пациентките. В контролната група жени подобни трудности не са регистрирани.

Всички жени, имали проблем със зачеването, са потърсили специалист. Подлежащата причина при пациентките в напреднал стадий е ендометриоза, а при пациентките в ранния стадий не е установена. Лечение на инфертилитета е предприето при 40% (n=2) от жените в пациентската група. Обединени данни за бременността и фертилитета при пациентките и контролите са показани в Таблица 10.

Таблица 5. Данни за фертилитета в трите групи участници

Показател	Пациенти/брой		Контроли/брой
	Стадий I-II	Стадий III-IV	
Бременност	**7**	**3**	**12**
Метод на зачеване:			
- **спонтанно**	**7**	**2**	**12**
- **асистирана репродукция**	**-**	**1**	**-**

Изход от бременността:			
- **здраво(и) дете/деца**	**7**	**3**	**15**
- **спонтанен аборт**	**1**	**-**	**2**
- **аборт по желание**	**1**	**-**	**-**
Трудности при забременяване	**2**	**3**	**-**
Открита причина за проблема	**-**	**3**	**-**
Лечение на инфертилитета	**-**	**2**	**-**

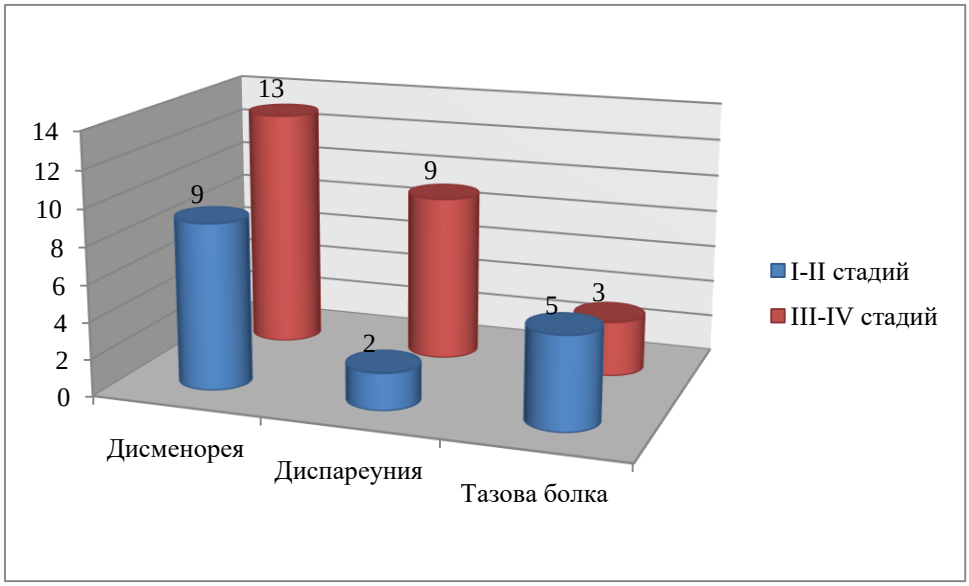
1.3 Болка

Чрез редица въпроси, свързани с най-характерните болкови синдроми при ендометриоза, се събра подробна информация за клиничната изява на болестта. Обобщената информация е представена на Фигура 9. Най-честият симптом, съобщен от пациентките, е дисменореята – засяга 73% (n=22), като в групата на ранната ендометриоза са засегнати 60% (n=9), а в групата на късната – 87% (n=13). Вторична дисменорея с давност между четири месеца и четири години е регистрирана при 20% (n=6) от пациентките, поравно разпределени между двете групи. Всички пациентки с дисменорея приемат обезболяващи медикаменти за справяне с болката. Те включват широка гама от препарати от групата на нестероидни противовъзпалителни, аналгетици и спазмолитици. За нарушено качеството на живот в резултат от дисменореята споделят 45% (n=10) от страдащите от нея. В това направление не се открива разлика между двете групи.

Болката при полов акт засяга 37% (n=11) от пациентките с ендометриоза. В стадий I-II са засегнати 13% (n=2), а в стадий III-IV – 60% (n=9). Честотата на поява на симптома варира при различните пациентки. От съобщилите за наличието му 55% (n=6) споделят, че болката е налична при всеки полов акт, 9% (n=1) – в повече от половината случаи, 9% (n=1) – в половината случаи и 27% (n=3) – в по-малко от половината случаи.

Тазовата болка, описана като такава непричинена от менструация, полов акт, операция, бременност, раждане, спортна/битова травма, реакция към храни, чревен вирус, е регистрирана при 27% (n=8) от пациентската група. Разглеждайки групата според стадия на болестта се забелязва, че

неспецифичната тазова болка се открива при 33% (n=5) от жените в ранен стадий и при 20% (n=3) от тези в напреднал стадий. Честотата на поява на болката варира между пациентките, като 38% (n=3) от засегнатите я описват като честа (1-2 пъти седмично). Пациентките с честа болкова симптоматика приемат обезболяващи за справяне със симптома.



Фигура 8. Пациентки, засегнати от различни прояви на болков синдром, разпределени по стадии

1.4 Медицинска история

Нито една от участничките в пациентската група няма диагностициран рак към момента на взимане на пробата или преди това. Също така, нито една няма структурна аномалия, засягаща репродуктивната система.

Предходни оперативни интервенции са претърпели 33% (n=10) от жените с ендометриоза, а общият брой на операциите за всички е 13. От оперираните жени 60% (n=6) са в начален стадий на ендометриоза и 40% (n=4) – в напреднал стадий. Поводът за оперативна интервенция в 54% (n=7) от случаите е ендометриоза. От седемте жени, подложени на операция в миналото, 33% (n=2) съобщават, че ендометриозна лезия не е открита. Останалите включват яйчникови кисти (не ендометриоми), мамарен фиброаденом, апендектомия и херния.

По отношение на симптомите, засягащи стомашно-чревния тракт, 10% (n=3) от пациентките съобщават за такива през последната година. Те включват ходене по голяма нужда по-малко от три пъти седмично, спешен позив за ходене по

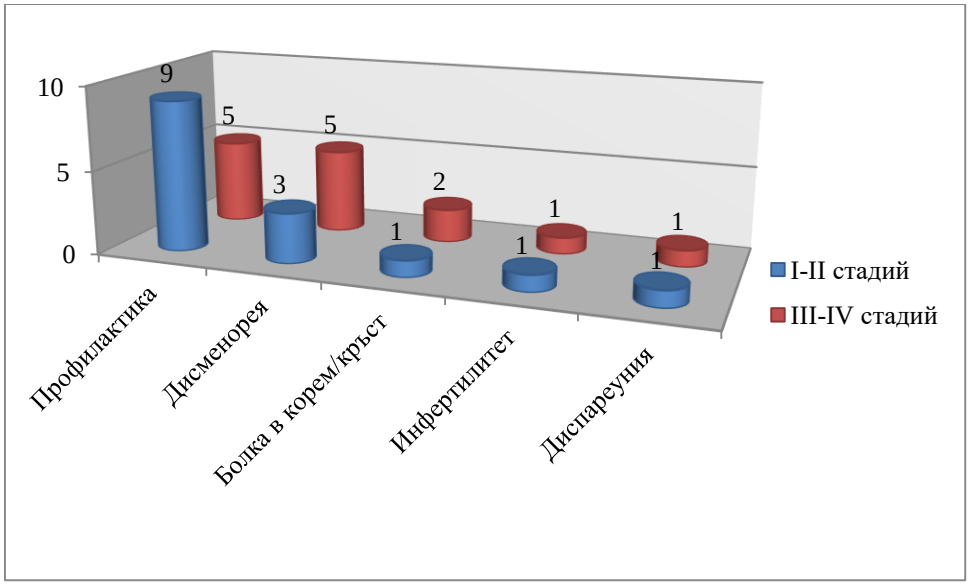
голяма нужда и чувство за недоизхождане. Симптоми, засягащи уринарната система, имат 6,7% (n=2) от пациентките с ендометриоза, при които присъстват и гореспоменатите прояви. Те споделят за чувство на недоизпразване на пикочния мехур, трудности при отделяне на урина и чести уроинфекции.

При 73% (n=22) от участничките в пациентската група диагнозата ендометриоза е била поставена при предишни изследвания. В 22,7% (n=5) от случаите това е станало чрез извършена лапароскопия, при 4,5% (n=1) – чрез отворена операция и при останалите 72,2% (n=16) – чрез ултразвуково изследване или ЯМР. Средната възраст на диагностициране на ендометриозата е 30 години, а максималната и минималната са съответно 45 и 19 години.. Диагнозата е поставена в рамките на година от началото на симптомите.

Причините, които са накарали пациентките с ендометриоза да потърсят лекарска помощ, могат да бъдат разделени в няколко категории (Фиг. 10). Най-голям брой – 42% (n=14) от тях не са имали конкретно оплакване, а са посетили акушер-гинеколога си за профилактичен преглед. От тях 64% (n=9) имат начален стадий на ендометриоза, а останалите – напреднал. Болката е най-честият симптом, който води жените в лекарския кабинет. Дисменорея е докладвана от 27% (n=8) от жените при прегледа, като от тях 38% (n=3) са в ранен стадий на болестта и 62% (n=5) – в напреднал. Диспареуния е причина за търсене на лекарска помощ в 7% (n=2) от случаите, поравно разпределени в двата стадия. Болки в корема и кръста, а също и внезапна силна болка в същата област са довели до акушеро-гинекологичния кабинет 10% (n=3) от пациентките – 2/3 от III-IV стадий и 1/3 от I-II. Последният симптом, който посочват участничките от пациентската група като причина за търсене на лекарска помощ, е инфертилитетът. Той е посочен в 7% (n=2) от случаите, без разлика в разпределението между стадиите.

При 77% (n=23) от жените с ендометриоза липсва фамилност на болестта, при 20% (n=6) фамилната история е неясна и при 3% (n=1) има засегната майка. Фамилно обременената пациентка е в начален стадий на ендометриоза.

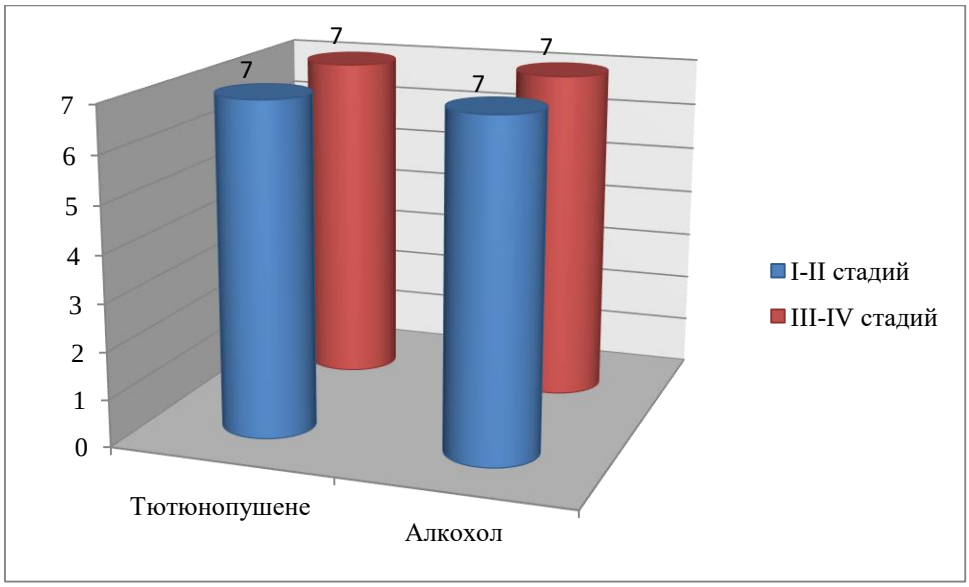
За период по-дълъг от три месеца 17% (n=5) от пациентките са приемали комбинирани орални контрацептиви, 7% (n=2) - гозерелин и единични случаи - антипсихотично средство, аналгетик, L-тироксин или хепарин с ниско молекулно тегло.



Фигура 9. Причини за търсене на лекарска помощ при пациентките с ендометриоза в различен стадий

1.5 Вредни навици

Вредните навици, за които беше събрана информация от участничките в пациентската група, са консумация на алкохол и тютюнопушене (Фиг. 11). При 47% (n=14) от жените е отчетено тютюнопушене, с еднакво разпределение между двата стадия. Консумацията на алкохол е докладвана от същия процент пациентки, отново разпределен поравно. По-голямата част от последните съобщават, че алкохол пият рядко (1-2 пъти седмично до 1-3 пъти месечно), предимно вино и бира.



Фигура 10. Вредни навици на пациентките с ендометриоза в различен стадий

2. Изолиране на ДНК от плазмени проби и създаване на ДНК банка

Изолирането на геномна ДНК се извърши от 38 плазмени проби. Качествения и количествения контрол на изолираната ДНК се отчетоха чрез два параметъра за всяка проба - концентрацията на ДНК (ДНК конц.) в ng/µl и съотношението на абсорбциите на монохроматична светлина с дължини на вълната 260 и 280 nm (260/280 DNA Ratio), които са показани в Таблица 11. От получените проби е създадена ДНК банка.

Таблица 6. Концентрация и съотношение 260/280 за ДНК от плазмени проби

Код на пациент	ДНК конц. ng/µl	ДНК 260/280
endo_01	356.6	1.89
endo_03	34.3	1.92
endo_04	-	-
endo_06	262.8	1.89
endo_07	282.9	1.89
endo_08	22.3	1.92
endo_10	434.5	1.87
endo_11	419.8	1.89
endo_12	498.5	1.86
endo_14	-	-
endo_15	17.5	2.18
endo_16	24.8	1.98
endo_17	20.7	2.04
endo_18	364	1.88
endo_19	94.4	1.74
endo_20	11.5	2.35
endo_21	13.7	1.8
endo_22	253.4	1.9
endo_23	15.6	1.99
endo_24	1077.2	1.89
endo_25	1074.4	1.88
endo_26	1074.4	1.88

endo_27	-	-
endo_28	735.4	1.9
endo_29	842.6	1.89
endo_30	-	-
endo_31	481.2	1.88
endo_32	650.5	1.89
endo_34	374.4	1.88
endo_35	70.1	1.92
endo_36	958.3	1.88
endo_37	537	1.88
endo_38	162.2	1.9
endo_39	110.2	1.89
endo_40	-	-
endo_41	243.5	1.89
endo_42	268.9	1.9
endo_43	423.6	1.92
endo_44	62.6	2.03
endo_45	382.7	1.88
endo_46	223.6	1.88
endo_47	179.2	1.9
endo_48	528.8	1.89
endo_49	-	-
endo_50	-	-

3. Изолиране на РНК от плазмени и тъканни проби и създаване на РНК банка

Изолиране на РНК се извърши на всички 45 плазмени и 45 тъканни проби. Качествения и количествения контрол на изолираната РНК се отчетоха чрез два параметъра концентрацията на рибонуклеиновите киселини (РНК конц.) в ng/µl и съотношението на абсорбциите на монохроматична светлина с дължини на вълната 260 и 280 nm (260/280 RNA Ratio), които са показани в таблица 12. От получените проби е създадена РНК банка.

Таблица 7. Концентрация и съотношение 260/280 за РНК от тъканни проби

Код на пациент	РНК конц. ng/µl плазма	РНК 260/280 плазма	РНК конц. ng/µl тъкан	РНК 260/280 тъкан
endo_01	20.2	1.09	12,5	4,69
endo_03	17.9	1.48	326,8	2,13
endo_04	32.9	1.53	50,6	2,05
endo_06	21.8	1.43	6,3	1,98
endo_07	12.2	1.5	64,9	2,22
endo_08	8.7	1.5	19,6	2,15
endo_10	9.3	1.33	130,4	2,24
endo_11	18.1	1.49	8	1,89
endo_12	15.3	1.57	41,5	2,07
endo_14	17.2	1.51	67,2	2,17
endo_15	13.6	1.6	217,4	1,98
endo_16	16.5	1.52	117,6	2,01
endo_17	16.9	1.53	213.6	1,99
endo_18	12.5	1.55	5,2	2,61
endo_19	7.1	1.23	23	2,21
endo_20	25.6	1.68	13,6	1,9
endo_21	10.6	1.18	17	2,97
endo_22	10.6	1.18	21,9	2,05
endo_23	8.3	1.52	44,9	2,27
endo_24	10.3	1.44	68	2,66
endo_25	21.4	1.51	8,1	1,85
endo_26	11.5	1.41	36,7	3,11
endo_27	25.5	1.53	11,7	1,86
endo_28	5.8	1.77	95,1	2,06
endo_29	13.4	1.41	87,6	2,06
endo_30	11.5	1.64	48,5	2
endo_31	15.7	1.7	125,2	2,06
endo_32	15.5	1.4	153.5	2,04
endo_34	10.4	1.63	91,1	2,05
endo_35	16.3	1.61	68,7	2,06

endo_36	11.4	1.57	10,8	1,92
endo_37	26.4	1.68	142,1	2,07
endo_38	13	1.54	51,3	2,26
endo_39	9.9	1.69	80	2,62
endo_40	12.7	1.49	27,5	2
endo_41	12.7	1.56	137,4	2,3
endo_42	33.3	1.49	311,5	2,17
endo_43	9.3	2.08	22,6	2,08
endo_44	9.4	1.43	28,1	2,89
endo_45	22.4	1.43	7,2	1,97
endo_46	16.8	1.49	31,8	2
endo_47	15.4	1.52	11,6	2,04
endo_48	22	1.45	98,7	2,05
endo_49	18.4	1.47	194,9	2,05
endo_50	18.4	1.45	124,2	2,05

4. Експресионен анализ

МиРНК експресионен анализ се проведе на всяка една от сборните проби. Резултатите показват значителна разлика между пациентските и контролните групи. За нормализиране на получените резултати от анализа бяха изключени всички миРНКи със Ct > 35. За значима разлика в нивата на експресия, съобразно протокола на производителя, беше прието двукратно отклонение. За нормализиране на разсейването на данните и намаляване ефекта на оперативните експериментални вариации само миРНКи с променена експресия в границата на две стандартни отклонения бяха подложени на следващите стъпки на анализ.

4.1 МиРНК експресионен профил в плазма

4.1.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група

Първото сравнение в плазмените проби беше направено между групата пациентки в ранен стадий на ендометриоза и контролната група. Анализът на 84-те миРНК-и, включени в плаката, показа разлика в експресионните нива на

29 от тях (Табл. 13). При всички експресията в пациентската група е повишена спрямо контролната.

С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията на всички миРНК. На база на получените резултати, миРНК-ите с разликата в експресията могат да бъдат разделени в две групи: 1) 2 - 57-кратна разлика и 2) ≥58-кратна разлика. Това разделение дава възможност да се дефинират миРНКите с най-значима промяна в експресията в плазма при сравнение между пациентки в ранен стадий на ендометриоза и здрави контроли - повишена експресия над 58 пъти. На първо място това е миР-21-5р (101.49-кратна разлика), следвана от миР-26b-5р (89.27-кратна разлика) и миР-18a-5р (84.84-кратна разлика).

Таблица 8. Циркулиращи миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в ранен стадий на ендометриоза и здрави контроли

МиРНК	$2^{-\Delta Ct}$		N-кратна промяна в експресията
	I-II стадий	Контролна група	
hsa-let-7a-5p	453.8536448	8.466896968	53.60
hsa-miR-106b-5p	38.9643632	2.090478685	18.63
hsa-miR-126-3p	151.7532215	5.490103447	27.64
hsa-miR-150-5p	128.1405549	4.832713044	26.51
hsa-miR-106a-5p	40.01817119	2.48084798	16.13
hsa-miR-17-5p			
hsa-miR-18a-5p	51.82525243	0.610825981	84.84
hsa-miR-195-5p	860.2328014	18.55625065	46.35
hsa-miR-19a-3p	51.78934235	3.552496759	14.57
hsa-miR-19b-3p	36.73499908	4.534153815	8.10
hsa-miR-20a-5p	104.0464068	9.118732683	11.41
hsa-miR-21-5p	231.8556918	2.284428571	101.49
hsa-miR-223-3p	1033.328559	78.07741228	13.23
hsa-miR-23a-3p	114.2130216	10.06889412	11.34
hsa-miR-25-3p	365.2102214	8.327210729	43.85
hsa-miR-27a-3p	34.46555479	1.439764981	23.93
hsa-miR-30d-5p	28.81170901	1.543101899	18.67

hsa-miR-423-5p	17.20890424	1.806044366	**9.52**
hsa-miR-92a-3p	569.5123564	20.3059882	**28.04**
hsa-miR-93-5p	36.5952205	3.900971162	**9.38**
hsa-let-7c-5p	52.27623494	2.161201118	**24.18**
hsa-miR-148a-3p	15.43446246	0.390889662	**39.48**
hsa-miR-26b-5p	451.0311714	5.051925392	**89.27**
hsa-miR-30e-5p	27.63803867	3.239639615	**8.53**
hsa-miR-374a-5p	35.29968326	1.108672557	**31.83**
hsa-miR-15b-5p	210.1219886	7.636085907	**27.51**
hsa-miR-16-5p	1133.511516	65.33722756	**17.34**
hsa-miR-191-5p	88.03976159	5.539797853	**15.89**
hsa-miR-24-3p	19.29403968	3.736877662	**5.16**
hsa-miR-26a-5p	251.0069209	13.78314617	**18.21**

4.1.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група

Последващият анализ обхвана групата на пациентите в късен стадий на ендометриоза, сравнена с контролната група. Резултатите показаха, че 41 от общо 84-те миРНК-и имат повишена експресия при пациенти спрямо контроли (Табл. 14).

С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията навсички миРНК. Базирайки се на получените резултати, можем да разделим миРНК-ите в две групи: 1) 2 – 303-кратна разлика и 2) ≥304-кратна разлика в експресията. Във втората група влизат пет миРНК-и, при които е детектирана най-значима разлика в експресията между пациенти и контроли – водеща е let-7a-5p с 430.09-кратна разлика, следвана от миР-195-5p (401.84-кратна разлика), миР-26b-5p (326.62-кратна разлика), миР-106b-5p (317.03-кратна разлика) и миР-21-5p (312.88-кратна разлика).

Таблица 9. Циркулиращи миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в напреднал стадий на ендометриоза и здрави контроли

МиРНК	**$2^{-\Delta Ct}$**		**N-кратна промяна в експресията**
	III-IV стадий	**Контролна група**	

hsa-let-7a-5p	3641.540899	8.466896968	**430.09**
hsa-miR-100-5p	5.39017956	0.579079501	**9.30**
hsa-miR-106b-5p	662.7556865	2.090478685	**317.03**
hsa-miR-126-3p	831.3621942	5.490103447	**151.42**
hsa-miR-146a-5p	12.84676611	0.870449999	**14.75**
hsa-miR-150-5p	54.39240581	4.832713044	**11.25**
hsa-miR-106a-5p hsa-miR-17-5p	561.1852708	2.48084798	**226.20**
hsa-miR-18a-5p	168.8189836	0.610825981	**276.37**
hsa-miR-192-5p	42.73461836	0.209763175	**203.72**
hsa-miR-195-5p	7456.760725	18.55625065	**401.84**
hsa-miR-19a-3p	454.2470495	3.552496759	**127.86**
hsa-miR-19b-3p	369.9876573	4.534153815	**81.60**
hsa-miR-20a-5p	1832.16451	9.118732683	**200.92**
hsa-miR-21-5p	714.7690389	2.284428571	**312.88**
hsa-miR-221-3p	19.67556737	2.671839476	**7.36**
hsa-miR-222-3p	23.26893592	1.377290926	**16.89**
hsa-miR-223-3p	1026.368678	78.07741228	**13.14**
hsa-miR-23a-3p	102.7741289	10.06889412	**10.20**
hsa-miR-25-3p	1909.96877	8.327210729	**229.36**
hsa-miR-27a-3p	73.58466998	1.439764981	**51.10**
hsa-miR-29a-3p	33.41290081	1.977713345	**16.89**
hsa-miR-30d-5p	126.8810965	1.543101899	**82.22**
hsa-miR-423-5p	50.46927067	1.806044366	**27.94**
hsa-miR-574-3p	4.784384487	0.265693223	**18.00**
hsa-miR-92a-3p	2280.814393	20.3059882	**112.32**
hsa-miR-93-5p	656.8104785	3.900971162	**168.37**
hsa-let-7c-5p	286.2899732	2.161201118	**132.46**
hsa-miR-128-3p	11.92017353	0.194633687	**61.24**
hsa-miR-130b-3p	31.50116618	0.563244542	**55.92**

hsa-miR-148a-3p	69.90546465	0.390889662	**178.83**
hsa-miR-15a-5p	46.92657732	0.405516728	**115.72**
hsa-miR-26b-5p	1650.094957	5.051925392	**326.62**
hsa-miR-30e-5p	186.2805625	3.239639615	**57.50**
hsa-miR-374a-5p	188.8809422	1.108672557	**170.36**
hsa-miR-103a-3p	213.3877184	2.099190845	**101.65**
hsa-miR-15b-5p	2028.690875	7.636085907	**265.67**
hsa-miR-16-5p	8745.549587	65.33722756	**133.85**
hsa-miR-191-5p	729.7878558	5.539797853	**131.73**
hsa-miR-22-3p	77.83425558	2.501569151	**31.11**
hsa-miR-24-3p	58.7018202	3.736877662	**15.70**
hsa-miR-26a-5p	1085.642458	13.78314617	**78.76**

4.1.3 Сравнение между двата стадия

Важен резултат от анализа е отчетената промяна в експресията на миРНК-ите, припокриващи се при двете групи пациентки с ендометриоза. В Таблица 15 е отбелязано n-кратното повишение на експресията на тези миРНК-и – налична е информация за пациентските групи поотделно, както и сравнение между двете. За значима разлика в експресията между стадиите е приет резултат ≥2-кратна разлика. С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията между стадиите се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията навсички миРНК. В случая миРНК-ите могат да бъдат разделени в две групи: 1) 2-11,99-кратна разлика и 2) ≥ 12-кратна разлика. Резултатите показват повишена експресия в късния спрямо ранния стадий при 86,2% (n=25) от миРНК-ите, понижена експресия при 6,9% (n=2) и без промяна в експресията при 6,9% (n=2). Най-значимо се повишава експресията между стадиите при миР-93-5p (17,99-кратно), миР-20a-5p (17,6-кратно), миР-106a-5p миР-17(14.02-кратна разлика).

Таблица 10. Промяна в експресионните нива на циркулиращите миРНК-ите между двата стадия на ендометриоза

МиРНК	Промяна в експресията в група ранна ендометриоза	Промяна в експресията в група късна ендометриоза	N-кратна промяна в експресията между двата стадия
hsa-let-7a-5p	53.6	430.09	↑8.02
hsa-miR-106b-5p	18.63	9.3	↓2
hsa-miR-126-3p	27.64	151.42	↑5.48
hsa-miR-150-5p	26.51	11.25	↓2.36
hsa-miR-106a-5p	16.13	226.2	↑14.02
hsa-miR-17-5p			
hsa-miR-18a-5p	84.84	276.37	↑3.26
hsa-miR-195-5p	46.35	401.84	↑8.67
hsa-miR-19a-3p	14.57	127.86	↑8.78
hsa-miR-19b-3p	8.1	81.6	↑10.07
hsa-miR-20a-5p	11.41	200.92	↑17.6
hsa-miR-21-5p	101.49	312.88	↑3.08
hsa-miR-223-3p	13.23	13.14	-
hsa-miR-23a-3p	11.34	10.2	-
hsa-miR-25-3p	43.85	229.36	↑5.23
hsa-miR-27a-3p	23.93	51.1	↑2.13
hsa-miR-30d-5p	18.67	82.22	↑4.4
hsa-miR-423-5p	9.52	27.94	↑2.94
hsa-miR-92a-3p	28.04	112.32	↑4
hsa-miR-93-5p	9.38	168.37	↑17.99
hsa-let-7c-5p	24.18	132.46	↑5.48
hsa-miR-148a-3p	39.48	178.83	↑4.53
hsa-miR-26b-5p	89.27	326.62	↑3.66
hsa-miR-30e-5p	8.53	57.5	↑6.74
hsa-miR-374a-5p	31.83	170.36	↑5.36
hsa-miR-15b-5p	27.51	265.67	↑9.66
hsa-miR-16-5p	17.34	133.85	↑7.7
hsa-miR-191-5p	15.89	131.73	↑8.29

hsa-miR-24-3p	5.16	15.7	↑3.04
hsa-miR-26a-5p	18.21	78.76	↑4.33

4.2 МиРНК експресионен профил в тъкан

4.2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група

Анализът на експресионния профил на 84 тъканни миРНК-и, водещи до дерегулация на основни биологични пътища при различни патофизиологични процеси, показа разлика между пациентите с ендометриоза и здравите контроли. При сравнение на пациентките в ранен стадий на ендометриоза със здравите контроли се установиха 32 миРНК-и с понижена експресия и една с повишена (Табл. 16). С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията на всички миРНК. Това направи възможно миРНК-ите да бъдат разделени в две групи: 1) 2 – 9.3 кратна разлика и 2) ≥9.4-кратна разлика. По този начин се отличават три миРНК-и - миР-200c-3p (-30.4-кратна разлика), миР-196b-5p (-19.28) и миР-21-5p (-11.33-кратна разлика).

Таблица 11. Тъканни миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в ранен стадий на ендометриоза и здрави контроли

МиРНК	$2^{-\Delta Ct}$		N-кратна промяна в експресията
	I-II стадий	Контролна група	
hsa-miR-27b-3p	0.482522013	1.579900096	-3.27
hsa-miR-103a-3p	0.10045816	0.310966987	-3.1
hsa-miR-16-5p	0.060482713	0.238462338	-3.94
hsa-miR-26b-5p	1.483152213	5.041431124	-3.4
hsa-let-7g-5p	0.536134421	1.16379208	-2.17
hsa-miR-24-3p	0.300756259	2.545295809	-8.46
hsa-miR-155-5p	0.011806021	0.08483676	-7.19
hsa-miR-181b-5p	0.099626038	0.200939533	-2.02
hsa-miR-30b-5p	0.111079667	0.255223545	-2.3
hsa-miR-21-5p	0.622724811	7.055915743	-11.33

hsa-miR-30e-5p	0.165817326	0.344561481	**-2.08**
hsa-miR-200c-3p	0.087151341	2.64970791	**-30.4**
hsa-miR-223-3p	0.089725798	0.369804153	**-4.12**
hsa-miR-210-3p	0.009256398	0.045305604	**-4.89**
hsa-miR-99a-5p	0.348363811	0.096644627	**3.6**
hsa-miR-28-5p	0.008204702	0.028043949	**-3.42**
hsa-miR-23a-3p	0.848311877	4.556207125	**-5.37**
hsa-miR-25-3p	0.236132196	0.800422337	**-3.39**
hsa-miR-30a-5p	0.262368544	0.722381741	**-2.75**
hsa-miR-23b-3p	1.747953331	12.06564665	**-6.9**
hsa-miR-151a-5p	0.171308265	0.416917355	**-2.43**
hsa-miR-30d-5p	0.193803518	0.526254779	**-2.72**
hsa-miR-191-5p	0.722298293	1.842715481	**-2.56**
hsa-miR-106a-5p	0.020258437	0.073344538	**-3.62**
hsa-miR-17-5p			
hsa-miR-93-5p	0.09379577	0.423617276	**-4.52**
hsa-miR-186-5p	0.027368623	0.075093577	**-2.74**
hsa-miR-196b-5p	0.027904985	0.5380579	**-19.28**
hsa-miR-22-3p	0.0273876	0.064651755	**-2.36**
hsa-miR-128-3p	0.008382909	0.023000887	**-2.74**
hsa-let-7f-5p	0.672994522	2.865592235	**-4.26**
hsa-miR-20a-5p	0.038092919	0.165836483	**-4.35**
hsa-miR-106b-5p	0.022950457	0.089178104	**-3.89**
hsa-miR-100-5p	0.28295934	1.728874724	**-6.1**

4.2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група

Последващият анализ на групата пациентки с напреднала ендометриоза и здравите контроли показа 46 миРНК-и с понижена експресия и четири с повишена (Табл. 17). Дисрегулираните миРНК-и почти напълно припокриват тези от ранния стадий с изключение на една - миР-28-5р, която е с понижена експресия само в стадий I-II. С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията на всички миРНК. Така миРНК-ите условно се разделят в две групи в зависимост от

кратната промяна в експресията: 1) 2-33.99-кратна разлика и 2) ≥34-кратна разлика. Това позволява отличаването на четири миРНК-и - миР-200c-3p (-151.22-кратна разлика), миР-196b-5p (-139.54-кратна разлика) и let-7f-5p (-41.57-кратна разлика).

Таблица 12. Тъканни миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в напреднал стадий на ендометриоза и здрави контроли

МиРНК	$2^{-\Delta Ct}$		N-кратна промяна в експресията
	III-IV стадий	Контролна група	
hsa-miR-9-5p	0.008767209	0.019516435	-2.23
hsa-miR-150-5p	0.340879403	1.551682441	-4.55
hsa-miR-27b-3p	0.567358815	1.579900096	-2.78
hsa-miR-103a-3p	0.087433704	0.310966987	-3.56
hsa-miR-16-5p	0.058896811	0.238462338	-4.05
hsa-miR-26a-5p	1.46848989	7.705204961	-5.25
hsa-miR-26b-5p	0.400349895	5.041431124	-12.59
hsa-let-7g-5p	0.299438853	1.16379208	-3.89
hsa-miR-30c-5p	0.234122149	0.860253245	-3.67
hsa-miR-185-5p	0.007052416	0.037339161	-5.29
hsa-miR-24-3p	0.410181217	2.545295809	-6.21
hsa-miR-155-5p	0.007874114	0.08483676	-10.77
hsa-miR-146a-5p	0.003317549	0.027220424	-8.2
hsa-miR-181b-5p	0.097013769	0.200939533	-2.07
hsa-miR-30b-5p	0.111054005	0.255223545	-2.30
hsa-miR-21-5p	0.256376038	7.055915743	-27.52
hsa-miR-30e-5p	0.087131207	0.344561481	-3.95
hsa-miR-200c-3p	0.017522268	2.64970791	-151.22
hsa-miR-15b-5p	0.197830028	0.402436575	-2.03
hsa-miR-223-3p	0.064361124	0.369804153	-5.75
hsa-miR-194-5p	0.003091094	0.022217393	-7.19
hsa-miR-210-3p	0.009843133	0.045305604	-4.6
hsa-miR-99a-5p	0.249365422	0.096644627	2.58
hsa-miR-374a-5p	0.002641061	0.02364753	-8.95
hsa-let-7a-5p	1.141818493	8.5494602	-7.49

hsa-miR-124-3p	0.00363289	0.02364753	**-6.51**
hsa-miR-23a-3p	0.318272262	4.556207125	**-14.32**
hsa-miR-25-3p	0.104337765	0.800422337	**-7.67**
hsa-let-7e-5p	1.145782599	2.883524606	**-2.52**
hsa-miR-126-3p	0.138440056	0.557805217	**-4.03**
hsa-miR-424-5p	0.088838776	0.562074525	**-6.33**
hsa-miR-30a-5p	0.206374029	0.722381741	**-3.5**
hsa-miR-23b-3p	0.747079321	12.06564665	**-16.15**
hsa-miR-151a-5p	0.091399706	0.416917355	**-4.56**
hsa-miR-195-5p	0.177677553	0.63897586	**-3.6**
hsa-miR-143-3p	0.17953454	0.043823039	**4.1**
hsa-miR-30d-5p	0.149304891	0.526254779	**-3.52**
hsa-miR-191-5p	0.31476201	1.842715481	**-5.85**
hsa-let-7b-5p	6.418932248	2.657064654	**2.42**
hsa-miR-106a-5p	0.007433891	0.073344538	**-9.87**
hsa-miR-17-5p			
hsa-miR-93-5p	0.056068463	0.423617276	**-7.56**
hsa-miR-186-5p	0.02985949	0.075093577	**-2.51**
hsa-miR-196b-5p	0.003856034	0.5380579	**-139.54**
hsa-miR-22-3p	0.13805675	0.064651755	**2.14**
hsa-miR-130a-3p	0.077553373	0.299750348	**-3.87**
hsa-miR-128-3p	0.004030944	0.023000887	**-5.71**
hsa-let-7f-5p	0.068932748	2.865592235	**-41.57**
hsa-miR-20a-5p	0.016023502	0.165836483	**-10.35**
hsa-miR-106b-5p	0.018689002	0.089178104	**-4.77**
hsa-miR-100-5p	0.127567553	1.728874724	**-13.55**

4.2.2 Сравнение между двата стадия

Сравнението на промяната в експресията между двата стадия на болестта е показано в Таблица 18. От общо 32-те миРНК-и, които се детектират с променена експресия и в двете пациентски групи, 41% (n=13) имат значима разлика в експресията (≥2-кратна разлика) между двата стадия. При всички тях се наблюдава понижаване на експресията с напредване на ендометриозата. С цел да се конкретизират миРНК-ите с най-отчетлива промяна в експресията

между стадиите се прие условна разлика от двукратно увеличена средна стойност от n-кратната промяна в експресията на всички миРНК. Условно миРНК-ите се разделят в две групи в зависимост от разликата в експресията: 1) 2-7.1-кратна разлика и 2) ≥7.2-кратна разлика. Най-значимо е понижаването при let-7f-5p (9.76-кратна разлика) и миР-196b-5p (7.24-кратна разлика).

Таблица 13. Промяна в експресионните нива на тъканните миРНК-ите между двата стадия на ендометриоза

МиРНК	Промяна в експресията в група ранна ендометриоза	Промяна в експресията в група късна ендометриоза	N-кратна промяна в експресията между двата стадия
hsa-miR-27b-3p	-3.27	-2.78	-
hsa-miR-103a-3p	-3.1	-3.56	-
hsa-miR-16-5p	-3.94	-4.05	-
hsa-miR-26b-5p	-3.4	-12.59	↓3.7
hsa-let-7g-5p	-2.17	-3.89	-
hsa-miR-24-3p	-8.46	-6.21	-
hsa-miR-155-5p	-7.19	-10.77	-
hsa-miR-181b-5p	-2.02	-2.07	-
hsa-miR-30b-5p	-2.3	-2.3	-
hsa-miR-21-5p	-11.33	-27.52	↓2.43
hsa-miR-30e-5p	-2.08	-3.95	-
hsa-miR-200c-3p	-30.4	-151.22	↓4.97
hsa-miR-223-3p	-4.12	-5.75	-
hsa-miR-210-3p	-4.89	-4.6	-
hsa-miR-99a-5p	3.6	2.58	-
hsa-miR-23a-3p	-5.37	-14.32	↓2.67
hsa-miR-25-3p	-3.39	-7.67	↓2.26
hsa-miR-30a-5p	-2.75	-3.5	-
hsa-miR-23b-3p	-6.9	-16.15	↓2.34
hsa-miR-151a-5p	-2.43	-4.56	-
hsa-miR-30d-5p	-2.72	-3.52	-
hsa-miR-191-5p	-2.56	-5.85	↓2.29
hsa-miR-106a-5p	-3.62	-9.87	↓2.73
hsa-miR-17-5p			
hsa-miR-93-5p	-4.52	-7.56	-
hsa-miR-186-5p	-2.74	-2.51	-
hsa-miR-196b-5p	-19.28	-139.54	↓7.24
hsa-miR-22-3p	-2.36	2.14	-
hsa-miR-128-3p	-2.74	-5.71	↓2.08
hsa-let-7f-5p	-4.26	-41.57	↓9.76
hsa-miR-20a-5p	-4.35	-10.35	↓2.38
hsa-miR-106b-5p	-3.89	-4.77	-
hsa-miR-100-5p	-6.1	-13.55	↓2.22

5. Биоинформационен анализ

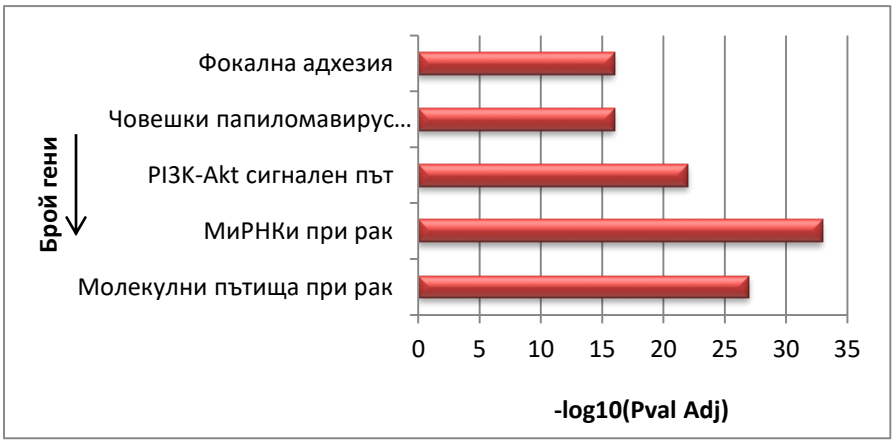
Биоинформационният анализ на избраните миРНК-ите с достатъчно отчетлива разлика в експресията между ектопичен ендометриум от пациентки с ендометриоза и еутопичен от контролна група жени разкри най-значимите GO биологични пътища и KEGG пътища. В Таблица 19 са посочени петте най-значими GO биологични пътища за всяка една от четирите миРНКи, покриваща критериите за отчетлива експресионна разлика в тъканните проби. Таблицата включва име на пътя, негов стандартизиран код, включения брой гени, релативно обогатяване (измерва се чрез формулата (детектирани гени/брой миРНК-и/(гени, които са част от анотацията/всички гени в базата данни), като колкото по-голямо е полученото число, толкова по-качествено е относителното обогатяване) и коригирана p-стойност (Pval Adj).

Таблица 14. Най-значими GO биологични пътища, в които участват миР-200c, миР-196b, миР-21 и миР-7f

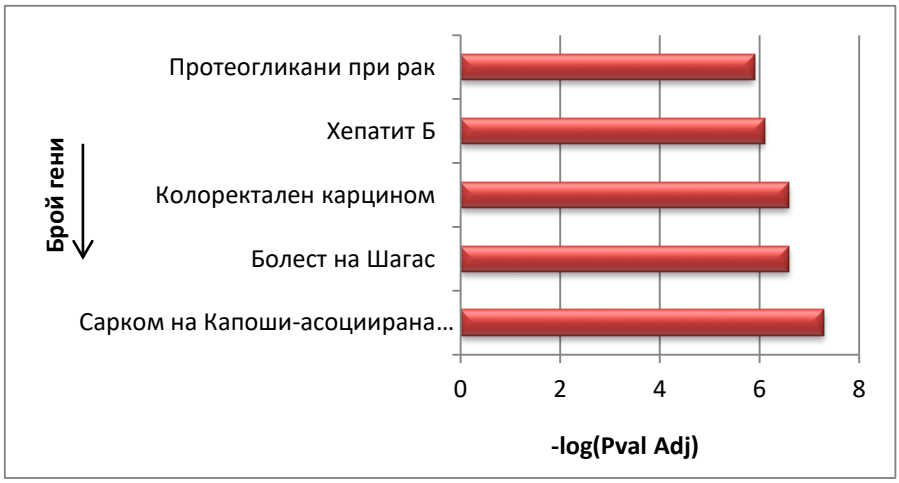
Име на пътя	Код	Брой гени	Релативно обогатяване	Pval Adj
	hsa-miR-200c-3p			
Позитивна регулация на клетъчната пролиферация	GO:0008284	19	2.455e+01	5.194e-18
Негативна регулация на транскрипцията от РНК полимераза II	GO:0000122	19	1.657e+01	3.830e-15
Негативна регулация на апоптозата	GO:0043066	16	2.108e+01	3.196e-14
Регулация на транскрипцията	GO:0006357	19	1.155e+01	1.328e-12
Позитивна регулация на генната експресия	GO:0010628	14	1.931e+01	6.278e-12
	hsa-miR-196b-5p			
Регулация на	GO:0006355	8	2.906e+01	5.083e-08

транскрипцията, dna-templated				
Регулация на транскрипцията	GO:0006357	8	2.632e+01	5.551e-08
Негативна регулация на клетъчния размер	GO:0045792	3	1.089e+03	3.591e-07
Регулация на генната експресия	GO:0010468	5	5.760e+01	2.047e-06
Негативна регулация на миелоидната диференциация	GO:0045638	3	5.443e+02	2.554e-06
	hsa-miR-21-5p			
Апоптоза	GO:0006915	26	1.734e+01	2.982e-21
Негативна регулация на транскрипцията от РНК полимераза II	GO:0000122	26	1.524e+01	3.856e-20
Позитивна регулация на транскрипцията от РНК полимераза II	GO:0045944	27	1.138e+01	6.397e-18
Позитивна регулация на транскрипцията, dna-templated	GO:0045893	23	1.477e+01	1.535e-17
Сигнална трансдукция	GO:0007165	30	8.771e+00	3.050e-17
	hsa-let-7f-5p			
Белтъчна денедилация	GO:0000338	3	1.082e+03	6.900e-07
Разпознаване на грешки в ДНК	GO:0000715	3	4.427e+02	3.154e-06
Посттранслационни белтъчни модификации	GO:0043687	5	5.393e+01	3.256e-06
Цитокин-медииран сигнален път	GO:0019221	5	5.466e+01	4.569e-06
Транскрипционна регулация	GO:0060260	3	2.029e+02	2.820e-05

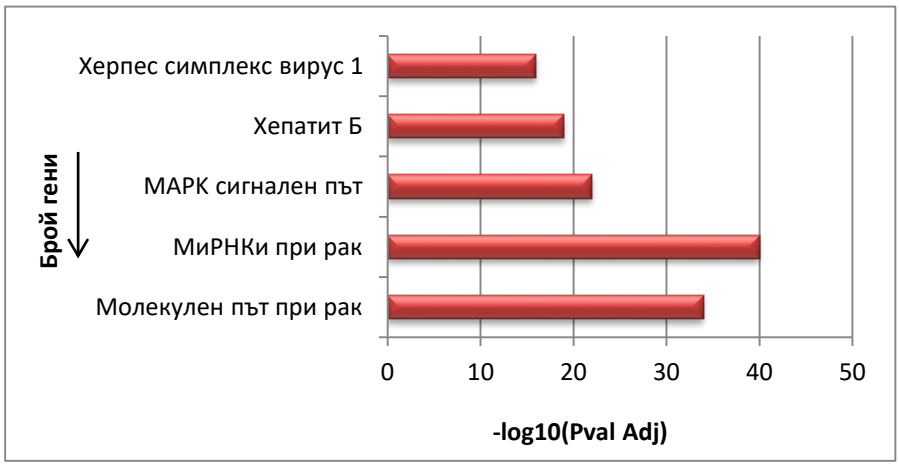
Най-значимите KEGG пътища на всяка от четирите миРНК-и поотделно са показани на Фигури 12-15.



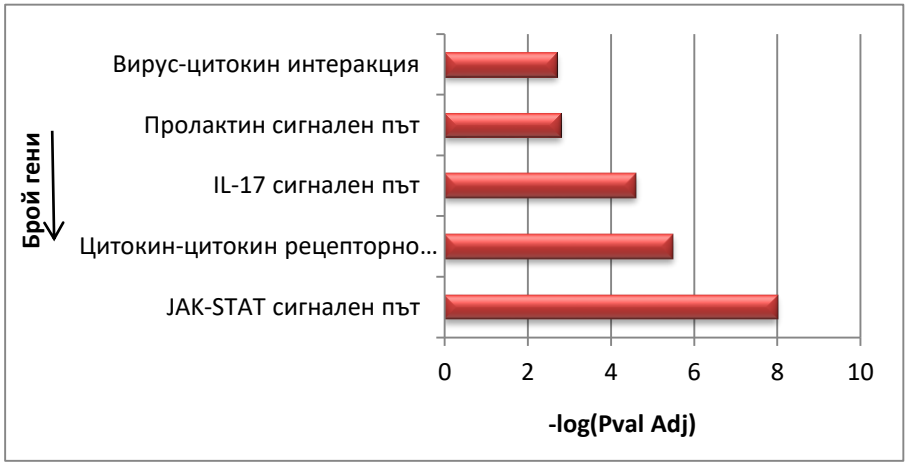
Фигура 11. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-200c



Фигура 12. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-196b



Фигура 13. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-21



Фигура 14. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-7f

IV. Обсъждане

1. Обсъждане на резултатите от клиничното характеризиране на пациентите в различен стадий на ендометриоза

Преработването на оригиналния въпросник на WERF е от важно значение за пациентките с ендометриоза и лекуващите ги лекари. Проучването ми не показа подобна инициатива да е правена до момента в България. Това лишава болничните звена, работещи с пациентки с ендометриоза, от унифициране на клиничните данни с международни клинични центрове и следователно от възможност за колаборация с тях. Въпросникът е важен елемент за постигане на стандартизирано характеризиране на болните. Извън възприетите методи за класификация по време на оперативна интервенция, съществуват важни нехирургични аспекти, които характеризират пациентките – начало, продължителност и тежест на симптоматиката, коморбидност, репродуктивни фактори, фамилна обремененост и други. Фактът, че липсва зависимост между изявата на симптоматиката и тежестта на лезиите, доказва, че е необходима разширена система за класификация, която да обединява хирургичните и клиничните данни и да дава възможност за определяне на „субтипове“ на ендометриоза и допълнително обогатяване на знанията за заболяването.

1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони

Първият показател, който трябва да имаме предвид при клинично и епидемиологично проучване, е възрастта на пациентите. В нашия случай се потвърждава фактът, че ендометриозата засяга жени в репродуктивна възраст

– средната възраст е 35 години за стадий I-II и за стадий III-IV. Данните не се различават от информацията, с която разполагаме до момента от мащабни международни проучвания (349). Възрастта на жените в контролната група е по-висока (средно 39 г.), като при тях по-често се срещат патологии, свързани с удебеляване на ендометриума и нарушения на менструацията (350).

Характеристиките на менструалния цикъл са от значение поради повишеният риск от настъпване на ретроградна менструация при по-продължителна експозиция на менструална кръв. В допълнение, менструалният цикъл повлиява естрогеновите нива, които се смятат за водещ фактор при развитие на ендометриоза (154). Рисковите фактори от страна на менструалния цикъл включват ранна възраст на настъпване на менархе, скъсен менструален цикъл (<27 дни), обилни и продължителни менструации (351, 352). Противно на очакванията, резултатите от настоящото проучване не откриха зависимост между менструалната история и ендометриозата (353). Едно от възможните обяснения е приемът на орални контрацептиви, които регулират менструалния цикъл (354). Те са най-често употребяваните хормонални препарати от пациентките с ендометриоза, независимо от стадия, като са изписвани на 33% от тях. Също така, мета-анализ, разглеждащ връзката между менструалния цикъл и ендометриозата, показва, че умерено повишаване на риска съществува само при ранна възраст на менархе (<12 години), а останалите характеристики имат пренебрежимо малко влияние (355). Затова е важно да се вземе предвид фактът, че рисковите фактори за развитие на болестта са изследвани при различни условия и в хетерогенни групи пациенти. Следователно, те трябва да бъдат приемани условно.

1.2 Бременност и фертилитет

Инфертилитетът/субфертилитетът е сред основните симптоми на пациентките с ендометриоза (141). Липсата на бременност и ендометриозата могат да се разглеждат в две направления – нулипаритетът като рисков фактор за болестта и невъзможността за забременяване като симптом на развита патология. Независимо от разглеждания аспект се налага внимателно събиране на данните, засягащи бременност и фертилитет от всички участници.

Резултатите показват категорична разлика между пациентките със и без ендометриоза. Паритетът при пациентките е двукратно по-нисък от този при

контролите. Забелязва се и отчетлива разлика между стадиите на болестта – в начален стадий паритетът е трикратно по-висок от напредналия. Трудностите при забременяване, регистрирани в 17% от пациентската група и липсващи в контролната, потвърждават, че ендометриозата причинява инфертилитет. В световен мащаб се съобщава за 30-50% от пациентките, които имат проблем със зачеването (35). По-ниският процент в нашата кохорта може би се дължи на относително младата възраст на пациентките. От друга страна, липсата на бременност увеличава риска за развитие на ендометриоза, тъй като циркулиращите естрадиол и естрон, които стимулират растежа на ектопичния и еутопичния ендометриум, са повишени при нераждали жени (356). Това обяснява значимо по-ниския процент на бременности при пациентките спрямо контролите, както и при ранната ендометриоза спрямо късната.

Увеличаването на риска от спонтанен аборт при пациентки с ендометриоза не се потвърждава от настоящото изследване (357). Спонтанен аборт е регистриран при 3% от пациентките и 7% от контролите. Невъзможно е да се определи точната причина за събитията, както и да се направи пряка асоциация между аборта и ендометриозата. И в двете групи процентът на засегнатите отговаря на очакваното за общата популация (358).

1.3 Болка

Болката е основна клинична характеристика на ендометриозата. Тя засяга различни локализации в тялото и варира при отделните пациентки. Подробната информация, събрана за болковата симптоматика, е важна за по-добро разбиране на клиничните прояви на болестта и по-ранно насочено търсене на лезии. Водещ симптом при пациентките е дисменореята, засягаща 73% от тях. Отчетен е по-голям брой засегнати в напредналия спрямо началния стадий на заболяването. Интерес представлява процентът на засегнати от вторична дисменорея, която според Американската колегия на акушер-гинеколозите (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) най-често се дължи на ендометриоза (359). Такава е регистрирана при 20% от пациентките без разлика между стадиите, което потвърждава, че вторичната дисменорея е сравнително чест симптом, проявяващ се независимо от прогресията на ендометриозата.

Диспареунията засяга повече от 1/3 от пациентките с ендометриоза, което е очакван процент сравнено с общата статистика (360). Ясно е изразена разликата между двата стадия – засегнатите в III-IV стадий отчетливо превалират над тези от I-II. Обяснение за този резултат може да се търси в патофизиологичния механизъм на диспареунията – локален ефект на лезиите, невронална сенсибилизация и/или съпътстващи заболявания (депресия, цистит и др.) (360).

Хроничната тазова болка е недостатъчно проучена и невинаги коректно диагностицирана симптоматика, засягаща 6-27% от жените по света (361). Смята се, че около 1/3 от тези жени имат ендометриоза (362). От пациентките, взели участие в настоящото проучване, 27% за сегнати от проблема. Интерес представлява фактът, че повечето засегнати са в групата на ранната ендометриоза. Това отново потвърждава твърдението, че няма пряка корелация между стадия на болестта и тежестта на симптоматиката. Освен това, все още не е ясно дали хроничната тазова болка е причинена от ендометриозата или двете са независими патологии (362). Ако второто е вярно, то е логично да няма зависимост между прогресията на болестта и изявата на хронична тазова болка.

Важно е да се обърне внимание на болката като симптом, който нарушава качеството на живот. Голяма част от пациентките твърдят, че приемат медикаменти за справяне с болката и че са търсили лекарска помощ и причина за нея, както й, че усещат разлика в качеството на живот. Това потвърждава дискутираната в редица проучвания връзка на хроничната болка при ендометриоза с намалена работоспособност, негативно повлияване на личните и професионални взаимоотношения и менталното здраве (146, 360, 362).

1.4 Медицинска история

Аномалиите на мюлеровите структури са рисков фактор за развитие на ендометриоза в ранна възраст (средно 18 години) (36). Сред пациентките, взели участие в изследването, няма такива с обструктивни или необструктивни пороци на развитието на репродуктивните органи. Логично е откритието, че има само една пациентка, диагностицирана на 19-годишна възраст, всички останали са били на възраст >20 години към момента на поставяне на диагнозата.

Раково заболяване на репродуктивната система или извън нея не е имала нито една от пациентките. Въпреки, че ендометриозата увеличава риска за развитие на светлоклетъчен и ендометроиден рак на яйчника, полученият резултат е очакван предвид възрастта на пациентките и минималното забавяне на лечението след поставянето на диагнозата (46).

Сред рисковите фактори за развитие на ендометриоза се нареждат и оперативните интервенции, най-вече в областта на малкия таз (363). Резултатите показват, че 1/3 от пациентките са били подложени на операция в миналото, като в половината случаи поводът е бил ендометриоза. Сравнението между стадиите показва леко превалиране на операциите при жените в раннен стадий. Гореизложеното доказва връзката между хирургичните интервенции и ендометриозата, но без да има зависимост с прогресията на болестта.

Данните, събрани от пациентската група, сочат, че симптомите от страна на уринарния и гастроинтестиналния тракт са сравнително по-редки от болковите симптоми. Те засягат 10% от жените с ендометриоза. Този резултат е очакван предвид факта, че симптомите от тези две системи не са водещи при изявата на ендометриозата. Данните за точната им честота са противоречиви, но се смята, че засягат между 4 и 37% в зависимост от засегнатите органи и различните източници (364).

Един от основните проблеми, засягащи жените с ендометриоза е закъсняването на диагнозата. В световен мащаб забавянето в средно 7 години (154). Резултатите от настоящото изследване показват, че няма значимо забавяне на диагностицирането след началото на симптоматиката**.** Причините затова са както от страна на пациентките (търсене на медицинска помощ при проява на симптоми, информираност относно заболяването, добра култура за редовни профилактични прегледи), така и от страна на лекарите (насочено търсене на ендометриозни лезии при симптоми от страна на пациента, добра квалификация за разпознаването им при образни изследвания).

Доброто клинично характеризиране е свързано с изясняване на причините, които карат пациентите да търсят лекарска помощ. Изненадващ е фактът, че при почти половината пациентки ендометриозата е открита случайно при профилактичен преглед. Предвид получените резултати за наличните симптоми, това означава, че част от пациентките имат изявени симптоми, но не

ги смятат за причина за тревога. Важно е да се отбележи, че повечето такива пациентки са в начален стадий на болестта. Това дава сигнал, че в част от случаите симптомите в по-ранните стадии са по-леки и не притесняват жените. При останалите пациентки, потърсили акушер-гинеколог във връзка с конкретен проблем, очаквано водеща е болковата симптоматика. Това потвърждава силната асоциация между болката (дисменорея, диспареуния, хронична тазова болка) и влошеното качество на живот. Прави впечатление, че само 7% от жените са се насочили към лекарския кабинет поради трудности за забременяване. Имайки предвид процентът на инфертилитет/субфертилитет сред жените с ендометриоза, резултатът е нисък, но това отново би могло да се обясни с възрастовата група, в която попадат пациентките.

Фактът, че ендометриозата има наследствен компонент е доказан преди повече от 40 години (365). Въпреки това, само една от пациентките в нашето проучване съобщава за родственик от първа линия с болестта. Този феномен може да се дължи на неразпознато заболяването или нетърсене на лекарска помощ при жени със симптоми. Също така, част от пациентките казват, че не знаят да имат такъв роднина, което означава, че е възможно да има засегнати жени, които по различни причини да не са споделили за проблема.

1.5 Вредни навици

Не е ясна връзката между тютюнопушенето и консумацията на алкохол с ендометриозата. Пушенето е рисков фактор за развитие на много заболявания, но по отношение на ендометриозата повечето източници го посочват като протективен фактор (154). Умерената консумация на алкохол се смята за рисков фактор, тъй като води до повишено ниво на естроген при жени, но изследванията са ограничени само до жени с инфертилитет (154). Противоречивите данни корелират с резултатите от настоящото проучване, които откриват, че почти половината от жените с ендометриоза за пушачи и също толкова консумират алкохол в ниско до умерено количество без да се открива разлика между стадиите.

2. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на миРНК-и в кръвна плазма

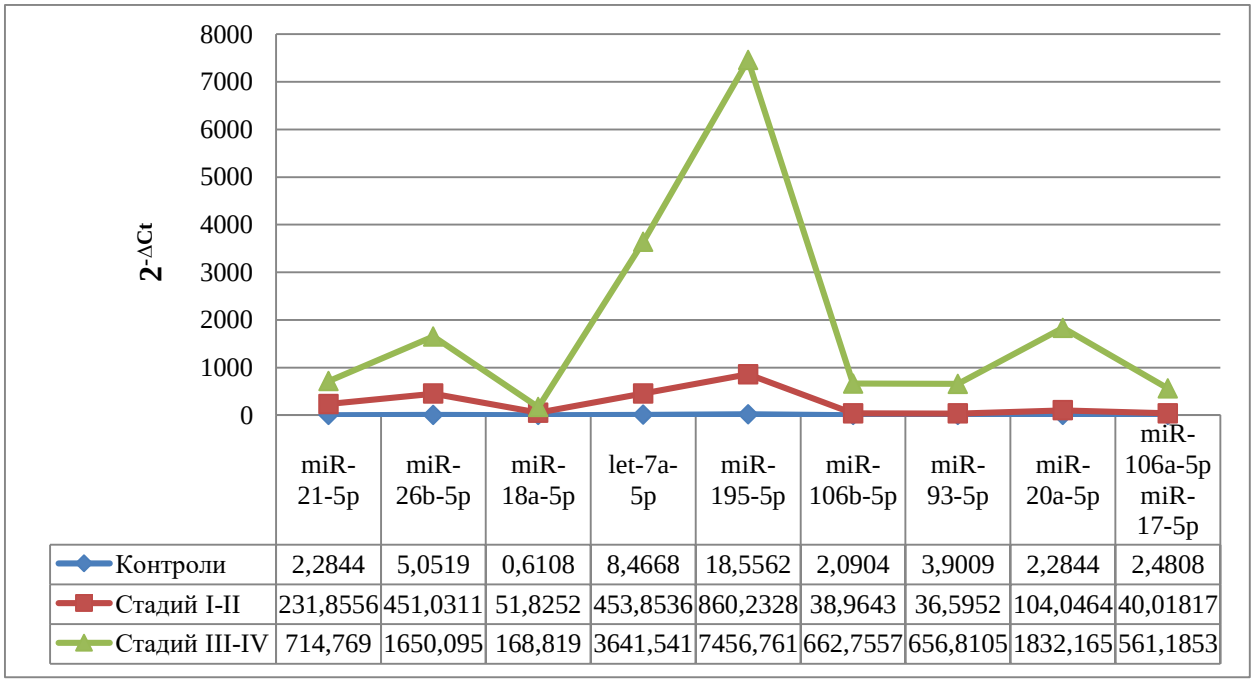
Сравнението на миРНК експресионния профил между жени със и без ендометриоза, както и между такива с ендометриоза в различен стадий дава

възможност за търсене на специфични за болестта разлики, които да бъдат основа за идентифициране на неинвазивен диагностичен и прогностичен биомаркер. Изборът за използване на сборни проби при провеждане на настоящото изследване цели детектиране на най-значимите промени в миРНК експресионния статус, които се срещат в голям процент от пациентите и минимизиране на ефекта на някои индивидуални различия.

Анализът на резултатите от двата стадия на ендометриоза позволи излъчването на три миРНК-и с най-отчетлива експресионна промяна между пациентите в ранен стадий и контроли; пет миРНКи с най-отчетлива експресионна промяна между пациентите в късен стадий и контроли и четири миРНК-и с най-отчетлива експресионна промяна между двата стадия. Две от миРНК-ите се припокриват между стадиите, което означава, че общо десет са миРНКите с най-голям потенциал за използване като неинвазивни биомаркери. Шест от тях (миР-21, миР-18a, let-7a, миР-195, миР-20a и миР-17) са детектирани и в други проучвания, свързани с ендометриозата и са номинирани като обещаващи биомаркери. Останалите четири (миР-26b, миР-106b, миР-93 и миР106a) се излъчват за пръв път или са споменавани еднократно като значимо дерегулирани в плазма на жени с ендометриоза. Всички миРНК-и са изучавани и асоциирани с различни заболявания. Това е очаквано, предвид факта, че всяка миРНК има много иРНК таргети и може да регулира различни сигнални пътища.

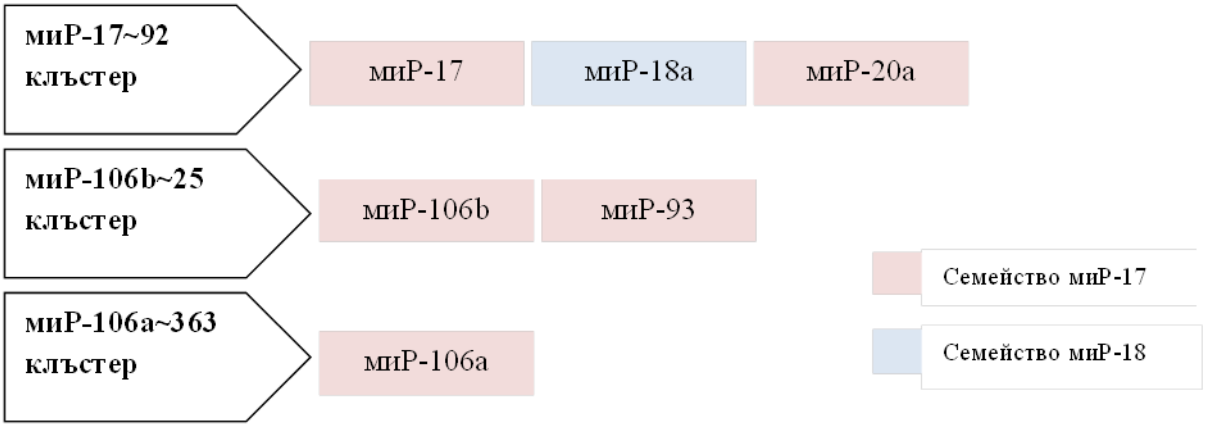
На този етап от знанията ни за миРНК-ите и методите за работа с тях е невъзможно самостоятелното им използване като биомаркер. Това е причината все повече автори да избират панел от миРНК-и, който синтезира различните патологични промени, характерни за болестта, и би бил по-надежден подход. С цел неинвазивният биомаркер да служи както за диагностициране, така и за прогнозиране на ендометриоза панелът включва десетте миРНК-и с най-отчетлива експресионна разлика в плазма на пациентки в различен стадий, сравнени с контролна група, както и помежду си. На Фигура 16 са изобразени графично разликите в експресията на миРНК-ите с най-значим потенциал за използване като диагностични и прогностични биомаркери между контролната група и групите на пациентки в ранен и късен стадий на ендометриоза.

Интересен резултат от настоящото проучване е липсата на корелация между припокриващите се миРНК-и с кръвна плазма и тъкан. Не за пръв подобно явление се наблюдава при изследвания с миРНК-и (366). Една от вероятни причини се крие в произхода на циркулиращите миРНК-и, за който все още липсва пълен консенсус (246). Затова е възможно клетките на ектопичния ендометриум да не са единственият източник на миРНК-и в кръвната плазма. Както вече беше споменато, ендометриозата води до специфични локални и системни изменения. Също така е възможен и обратния процес – настъпили локални и системни промени да промотират имплантацията на лезиите. И в двата случая е много вероятно детектираните дерегулирани миРНК-и в плазмата да се дължат на отговор на организма към патологичните промени, свързани с болестта. Подобен резултат повдига въпроса за методите, които се прилагат при търсене на неинвазивни биомаркери, а именно търсенето на корелация между нивата в плазма и тъкан (366). Това не изключва тъканните изследвания като метод за подробно изучаване на функцията на миРНК-ите и патогенезата на болестта, но е повод за размисъл върху възможността за пропускане на част от дерегулираните миРНК-и поради непровеждане на самостоятелно изследване в циркулацията.



Фигура 15. Разликите в експресията на миРНКите с потенциал за неинвазивен биомаркер за ендометриоза между контроли, пациенти в стадий I-II и стадий III-IV

МиРНК клъстерът е група от две или повече миРНК-и, които се транскрибират от разположени един до друг гени. Клъстерът миР-17~92 включва шест миРНК-и, сред които миР-17, миР-18а и миР-20а, включени в гореизложения панел (367). В човешкия геном има два негови паралога – клъстерите миР-106b~25, включващ миР-106b и миР-93, и миР-106а~363, включващ миР-106а (Фиг. 17). МиРНК семейството е група функционално свързани миРНК-и с еднаква “seed” последователност. Посочените три генни клъстера дават началото на четири миРНК семейства, в две от тях попадат всички миРНК-и, включени в панела – миР-17 и миР-18 (Фиг. 17).



Фигура 16. Геномна локализация на миРНКите от семействата миР-17 и миР-18, включени в панела за неинвазивни биомаркери

Малко след откриването на клъстерите е доказана и тяхната важна роля в туморогенезата. Това е причината те да се наричат „онкомиР“ (367). Множество проучвания върху трите клъстера категорично доказват ролята им в патогенезата на рака, но начинът, по който отделните миРНК-и модулират различни направления в този процес трябва да се разглежда индивидуално. Шест от общо десетте миРНК-и, избрани в панела като потенциални биомаркери, са част от тези две семейства. Знанията за останалите четири в голямата си част също са натрупани въз основа на изследвания при различни видове рак. Това потвърждава общите механизми, който съществуват между рака и ендометриозата.

Освен връзката с канцерогенезата, членовете на миР-17 семейството - миР-20а, миР-93, миР-17 и миР-106а са специфично експресирани в недиференцирани и диференцирани ембрионални стволови клетки (368). Смята се, че те имат основна регулаторна роля за клетъчната диференциация

по време на ранните етапи на вътреутробното развитие (368). Това откритие е в подкрепа на една от теориите за възникване на ендометриозата (за справка: раздел II, част **Error! Reference source not found.**) и придава още по-голяма достоверност на получените резултати. Освен общите познания за произхода и функцията на големите групи миРНК-и е важно всяка една да бъде разгледана поотделно, за да се придобие по-мащабна представа за възможностите й за използване като биомаркер.

2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група

От 29-те миРНКи, имащи значима разлика в нивото на експресия между пациентки и контроли, според приетите критерии, се излъчиха три с потенциал за неинвазивни биомаркери - миР-21-5p, миР-26b-5p и миР-18a-5p.

МиР-21 е сред първите идентифицирани миРНК-и, като е една от най-консервативните и широко разпространените в различни клетъчни типове (369). Повсеместното й разпространение позволява лесното й изолиране от повечето телесни течности и тъкани. Това е причината често да се споменава като кандидат-биомаркер за над 20 заболявания (369). Освен това, повишената й експресия се свързва, с прогресия и лоша прогноза при резлични патологии, в това число ендометриоза и рак на яйчника (370). От друга страна, проучванията върху животни показват, че вероятно миР-21 е фактор за успешна ембрионална имплантация и би могла да бъде прилагана като маркер за риск от развитие на инфертилитет/субфертилитет (371). На този етап това е само в сферата на предположенията, тъй като миР-21 не е проучена при хора и в кръвна плазма с такава насоченост. Предвид настоящия етап на знанията ни за тази миРНК и асоцииране то й с множество болести, няма как тя да бъде използвана за диагностика на ендометриоза. Възможно решение е тя да се търси в кохорта с вече открита ендометриоза като белег за прогресия или да се прилага в комбинация с други специфично променени миРНК-и.

МиР-26b има основна роля в канцерогенезата, изпълнявайки предимно тумор-супресорна функция. Чрез регулиране на гени като *CTGF*, *Smad1* и *PTEN* понижената й експресия способства за метастазирането и прогресията на различни малигнени заболявания (372, 373). Повишена експресия на миР-26b е открита при пациенти с Алцхаймер и се свързва с възникване на грешки по време на нормалния клетъчния цикъл (374). За разлика от представителя на

същото семейство миР-26а, миР-26b не се съобщава в проучвания за търсене на неинвазивни биомаркери. Детектирането му в настоящата разработка може да дължи на различен подход на работа – условията, при които се събират пробите, случаите на ендометриоза, които са разделени само по стадий, а не са ограничени в конкретна локализация на ендометриозата, използването на сборни проби и други.

Много са проучванията, които доказват връзката между дерегулираната **миР-18а** и канцерогенезата (375). Интересно е, че има данни за противоположното й действие - при някои видове рак промотира малигнизацията, докато при други инхибира пролиферацията на туморни клетки (375). Причината вероятно е различния механизъм, по който възникват раковите заболявания, дори и в един орган. Промените в експресията на циркулиращата миР-18а са проучвани като кандидат-биомаркер за някои видове рак, но поради липсата на корелация между плазма и тъкан, все още са в процес на допълнително доуточняване. Свръхекспресия на миР-18а е детектирана и преди в кръвна плазма на пациентки с ендометриоза, което потвърждава потенциала й за изпозлване като биомаркер за разграничане на жени със и без болестта (336).

2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група

Резултатите показват 41 миРНК-и с променена експресия при сравнение между пациентки в напреднал стадий на ендометриоза и контроли, като прави впечатление, че в тях са включени 29-те дерегулирани миРНК-и, открити в ранния стадий. Освен това, промяната в експресията на припокриващите се миРНК-и е по-значима в напредналия спрямо ранния стадий. Дерегулацията на еднакви миРНК-и в различен стадий на болестта показва, че те са надежден кандидат-биомаркер за диагностика. В допълнение, по-значимата експресионна разлика в късен стадий на ендометриоза е показателна за потенциала на миРНК-ите да се използват като маркер за прогресия. Наличието на миРНК-и с промяна в експресията в стадий III-IV, които липсват в стадий I-II, насочва, че напредването на заболяването е свързано с нарушена регулация на допълнителни молекулярни пътища. Според приетите критерии, се излъчиха пет с потенциал за неинвазивни биомаркери - let-7a-5p, миР-195-5p, миР-26b-5p, миР-106b-5p и миР-21-5p.

МиР-let-7 е едно от двете миРНК семейства, които първи са открити при *C. elegans* като основен регулатор на развитието (за справка: раздел II, част **Error! Reference source not found.**). МиР-let-7 регулира експресията на гени, участващи във важни молекулни пътища – канцерогенеза, JAK/STAT сигналния път, ДНК увреждане и апоптоза (376). Експресионният профил на let-7a е проучван при различни патологии – муковисцидоза, хепатит и други (377, 378). Експериментални миши модели показват понижена експресия на let-7 семейството, включително и let-7a, в ендометриум (379). Последващото търсене при хора показва понижена експресия и в плазмени проби. Това насочва авторите към предположението за основна роля на тази миРНК в патогенезата на болестта (379). Резултатите от настоящото проучване в тъканните миРНК потвърждават тази находка - let-7a, let-7b, let-7e, let-7f и let-7g са с понижена експресия в ектопичен ендометриум. Повишената експресия в плазмата, детектирана и в двата стадия на болестта, вероятно се дължи на причини извън ендометриума.

МиР-195 е позната като реагираща на стрес миРНК, асоциирана с широга гама от патологии при човека (380). Повишената й експресия се свързва с болестни промени в мозъка и сърцето, които са отговорни за развитие на Алцхаймер, шизофрения, сърдечна хипертрофия (380, 381). Най-много данни по отношение на миР-195 са събрани във връзка с дерегулацията й при някои видове рак след откритието, че тя таргетира различни тумор-супресорни и онкогени (380). МиР-195 е проучвана и във връзка с еднометриозата. В еутопичен и ектопичен ендометриум на засегнати жени тя е открита с понижена експресия, като таргетирайки гена за хемокин *FKN*, миР-195 спомага за преживяемостта на виталните клетки на ретроградната менструация в перитонеалната кухина и впоследствие улеснява формирането на ендометриозани лезии (382). Това съвпада с резултатите от настоящото проучване, които показват, че миР-195 е с понижена експресия в ектопичен ендометриум от жени в напреднал стадий на ендометриоза спрямо здрави контроли. От друга страна, в циркулацията на жени с ендометриоза и ендометриоза-асоцииран рак на яйчника миР-195 е открита с повишена експресия (366). Заедно с още няколко дерегулирани миРНК-и тя е предложена като надежден биомаркер за диагноза на ендометриоза (366). Тези изводи от различни източници потвърждават, че е

възможно да има разминаване в нивата на миРНК-ите между плазма и тъкан и това може да се обясни с механизма на действие на тези молекули.

Сред детектираните миРНК-и с най-отчетлива разлика в експресионния профил между жени в стадий III-IV на ендометриоза и контроли са **миР-26b** и **миР-21**, които вече бяха споменати като най-значимо дерегулирани и в стадий I-II. Важно е да се отбележи, че над три пъти е повишена разликата в експресията им в късния спрямо ранния стадий. Това дава основание да бъдат номинирани като водещи кандидати за биомаркери както за диагностициране, така и за прогнозиране на ендометриоза.

Добре изучена е онкогенната функция на **миР-106b**. Тя участва в регулацията на ключови сигнални пътища чрез таргетиране на гени, контролиращи клетъчния цикъл, клетъчната миграция, инвазия и метастазиране - *PTEN/AKT*, *LARP4B*, *Calponin 1*, *RUNX3*, *DAB2*, *FOG2* и др. (383). Свръхекспресията на миР-106b е свързана с различни видове рак и е предложена за неинвазивен биомаркер след детектирането й с променена експресия в плазма/серум (383, 384). МиР-106b таргетира и гените *F3* и *IL-8*, които стимулират клетъчната пролиферация в ендометриума и се асоциират с развитие на лейомиома (385). Изследванията при ендометриоза са оскъдни, но съществуват данни за понижена експресия в ектопичен ендометриум, което се свързва с характерните ангиогенни промени при ендометриоза (386).

2.3 Сравнение между двата стадия

Освен разликата в миРНК експресията между жени в различен стадий на ендометриоза и контроли е важно да се обърне внимание и на миРНК-ите, които показват най-значима разлика в експресията си между стадиите. Това е важен аспект от процеса по търсене на неинвазивен биомаркер за ендометриоза, тъй като освен за диагностициране, той трябва да служи и за отграничаване на ранните от напредналите случаи на болестта. Според приетите критерии се излъчват три миРНК - миР-93-5p, миР-20a-5p и миР-106a-5p мир-17.

МиР-93 е описана при различни видове рак в ролята на активиращ фактор на малигнения процес, а също и равитие на резистентност към антираковата терапия (387, 388). Данните сочат, че миР-93 е отговорна за развитието на ендометриален рак чрез таргетиране на гена *FOXA1*, който промотира процеса

на ЕМТ (388). Циркулиращата миР-93 е предложена за използване като диагностичен биомаркер за синдром на поликистозните яйчници и диабет тип 2 (389, 390). В ендометриозна тъкан миР-93 е детектирана с понижена експресия, което резултира в стимулира развитието на лезиите чрез повишаване експресията на гените *MMP3* и *VEGFA* и (391). Тези данни корелират с резултата от настоящото проучване, в което миР-93 е с понижена експресия в тъканни проби и в двата стадия на ендометриоза. Плазмените нива на миР-93 не са споменавани до този момент като потенциален биомаркер за ендометриоза.

Различни автори номинират **миР-20а** като диагностичен маркер за рак на назофаринкса, простата, колона и други след като е детектирана с повишена експресия в плазма/серум на пациенти (392). Влиянието ѝ в това направление основно е свързано с контролиране на TGF-β сигналната каскада (392). МиР-20 е предложена като важен участник в патогенезата на ендометриоза чрез таргетния си ген *NTN4*, който влияе на лезийния растеж чрез ангиогенно действие (393). Проучвания в китайска и иранска популация показват понижена експресия на миР-20а в плазма на пациентки с ендометриоза (327, 394). Резултатите от настоящото проучване са противоположни – миР-20а е с повишена експресия в плазмата на жени с ендометриоза.

Данните от експресионния анализ за **миР-106а** и **миР-17** са общи, тъй като поради разлика само от една база между секвенциите им, miScript чиповете на Qiagen не предлагат възможност за отделни PCR праймери и не могат да бъдат разграничени. МиР-106а, също както миР-20а, миР-93 и миР-106b са част от семейството на миР-17 (392). МиР-106а се открива с понижена експресия в различни тумори (395). Един от основните му таргети е *VEGFA*, имащ важно значение за туморния растеж, прогресиране и метастазиране (395). Променената му експресия в периферна кръв при пациенти с рак на гърдата дава основание миР-106а да се предложи като част от панел миРНК за неинвазивен биомаркер (396). Инхибирането на сигналния път PI3K/Akt/mTOR от миР-160а при пациентки с ендометриоза се асоциира с потискане на пролиферативния потенциал на ектопичния ендометриум и е част от новите терапевтични стратегии, обсъждани при ендометриоза (397). Няма достатъчно данни за нивата ѝ в плазма на пациентки с ендометриоза.

Освен в ролята си на „онкомиР“ миР-17 е позната и като регулатор на кардиопулмоналната функция (398). Поради тази причина тя е предложена като маркер за диагностика и прогресия на пациенти с първична артериална хипертония (398). Освен това, миР-17 е потенциален неинвазивен биомаркер и за диагноза на недребноклетъчен рак на белия дроб (399). Проучванията при пациентки с ендометриоза сочат понижена експресия на миР-17 в кръвта им спрямо контроли, като е открита негативна корелация с нивата на IL-4 и IL-6 (400). Резултатите от настоящото проучване показва противоположна посока на дерегулация на миР-17. Причината вероятно се дължи на сериозния му недостатък за невъзможността за индивидуално амплифициране на миР-106a и миР-17.

МиРНК експресионият анализ на сборни проби от кръвна плазма на пациентки с ендометриоза в различен стадий и контролна група даде възможност за идентификация на специфични за болестта промени. Степента на тези промени позволява категорично разграничаване на жени с и без ендометриоза, както и на жени с ендометриоза в различен стадий. Това дава основание да се смята, че миРНК-ите могат да бъдат използвани като надеждни диагностични и прогностични биомаркери за болестта. Предложените десет миРНК-и имат достатъчно значима разлика в експресията, за да бъдат включени в диагностично-прогностичен панел за ендометриоза.

3. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на тъканни миРНК-и

Въпросът за произхода на ендометриозата силно вълнува научната общност през последните десетилетия. Резултатите от множеството проучвания предоставят огромно количество информация, с която доскоро не разполагахме. Едновременно с това остават и много неотговорени въпроси. Както вече беше споменато, съществуващите теории дават обяснение за част от процеса на възникване на болестта, но без да го изясняват цялостно (за справка: раздел II, част **Error! Reference source not found.**).

Едно от важните направления в търсенето на етиологията на ендометриозата е изследването на ендометриалната тъкан и промените в нея. Ендометриумът е сложна тъкан, търпяща промени под действието на хормонална стимулация. Известно е, че еутопичният и ектопичният ендометриум на засегнати от

ендометриоза жени и ендометриума на здрави такива имат еднакъв хистологичен строеж, но между тях съществуват разлики на биохимично ниво (90, 105, 401). Освен това, промените в еутопичния ендометриум на пациентки с ендометриоза съвпадат с тези, открити в ектопичните лезии (401). Описаното дотук дава основание да се смята, че характеристиките на специфично променения ендометриум са ключ към откриване на патофизиологичните основи на ендометриозата. МиРНК-ите са идеална основа за търсене на такива промени, тъй като регулирайки генната експресия, те променят нормалното функциониране на различни молекулни пътища, което води до развитие на патологични за организма състояния.

Анализът на резултатите от експресионните нива на миРНК от ектопичен ендометриум на пациентки с ендометриоза и еутопичен на здрави жени показва отчетливи различия. В идентифицираните миРНК-и се открива забележителна идентичност - миР-200c-3p и миР-196b-5p са сред най-значимо дерегулираните при сравнение между ранен стадий на ендометриоза и контроли, между късен стадий на ендометриоза и контроли, както и между двата стадия. МиР-21-5p е детектирана със значимо намаляване на експресията в ранния стадий на болестта спрямо контроли, както и между стадиите, а миР- let-7f-5p е със значимо понижена експресия в късния стадий спрямо контролите и между двата стадия на ендометриозата. Тези резултати потвърждават, че в ектопичния ендометриум настъпват специфични промени, които го отличават от нормалния ендометриум на здрави жени. Познаването на тези промени е добра предпоставка за разгадаване на патогенетичната основа на ендометриозата.

Една от съществените пречки пред подробното проучване на ендометриума е неговата хетерогенност (321). Тъканта, която се взима оперативно и бива подложена на различни молекулярни проучвания, най-често съдържа следи от заобикалящите тъкани и телесни течности, което резултира в компрометиране на резултатите от анализа (321). Използваната техника на сборни проби осигурява детектиране само на най-значимите промени, налични в тъканта, а малките отклонения, които биха могли да се причинят от индивидуални замърсявания, се свеждат до минимум.

Изследванията върху ендометриална тъкан показват редица миРН-Ки с променена експресия. МиР-200 семейството се отличава като най-често присъстващото в резултатите от проучванията, а членовете му се детектират със сходно променена експресия при случаи на ендометриоза и рак на яйчника (за справка: раздел II, част **Error! Reference source not found.**). МиР-200 семейството е добре известно като важен фактор в процеса на канцерогенеза. Таргетирайки *ZEB* гените, които потискат активността на адхезивни молекули като Е-кадхерин, те улесняват ЕМП при развитието и прогресирането на раковия процес (402). Ендометриумът като динамична тъкан търпи молекулярни и клетъчни промени, част от които се регулират именно от миР-200 семейството и поради това е очаквано дисрегулацията на членовете му да води до развитие на патологични процеси (402). Част от основните таргети на **миР-200с** включват *ZEB1/2*, *VEGFA*, *FLT1*, които участват в процесите на клетъчен растеж и диференциация, ангиогенеза и възпаление, а нарушената им експресия води до трансформация на клетките (402). Експресията на миР-200с е детектирана с понижена експресия и в двата стадия на ендометриоза, като в напредналия стадий е пет пъти по-силно понижена. Това потвърждава предишни изследвания върху тъканната експресия на миР-200с и влиянието на миР-200с върху трансформацията на ендометриума и задълбочаването на процеса с прогресиране на болестта .

Представителите на миР-196 семейството таргетират много от гените от *HOX* клъстера (321). **МиР-196b** е третата най-често детекетирана дерегулирана миРНК в ендометриозни лезии (321). *HOX* гените кодират транскрипционни фактори, играещи основна роля в развитието на ендометриума и нормалната ендометриална рецептивност, а експресията на един от представителите на фамилията - *HOX10* – се повлиява от менструалния цикъл с пик в периода на имплантация (403, 404). Освен това, миР-196b е с доказана функция в регулацията на тъканната васкуларизация и оздравителни процеси, чрез таргетиране на *AKT1* (405). Всичко това доказва ролята на миР-196b за нормалното развитие на ендометриума и предполага асоциация на променената й експресия с развитие на ендометриоза и свързания с нея инфертилитет. В настоящото проучване миР-196b е сред най-отчетливо дерегулираните между тъканните миРНК-и в начален и късен стадий на ендометриоза и показва седем пъти понижаване на експресията между двата

стадия. Това потвърждава наличните данни за миР-196b експресията и ролята й в развитие на патологичния процес при ендометриоза (406).

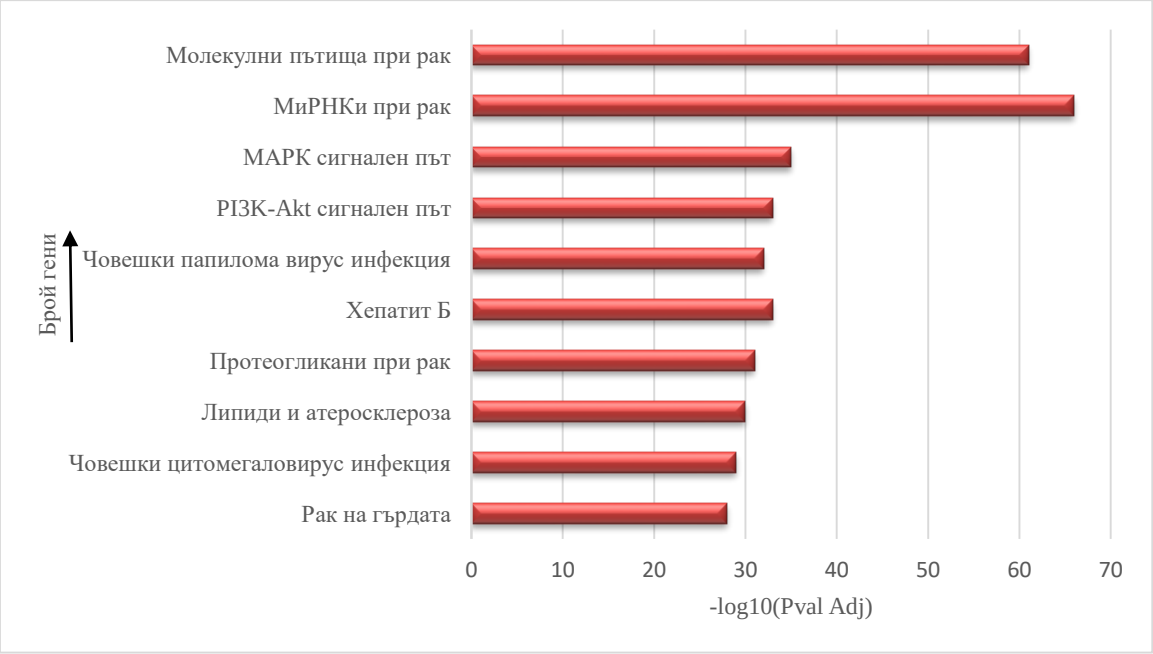
В раздел VI, част 2.1 е описана функцията и перспективите за използване на **миР-21** като неинвазивен биомаркер за ендометриоза. Експресията на миР-21 в ендометриална тъкан е проучвана във връзка с патогенезата на ендометриозата, като най-голямо значение се отдава на апоптозната й функция (407). Чрез директно инхибиране на *FasL* миР-21 е способна да стимулира апоптозата (407). Следователно, понижената експресия на миР-21 води до активиране на *FasL* и потискане на апоптозната функция, което от своя страна дава възможност за развитие на ендометриозните лезии. Такъв процес е логичен и от гледна точка на получените резултати, според които миР-21 е с понижена експресия в ранен и късен стадий на ендометриоза с почти 2.5-кратна разлика между двата.

Връзката между ендометриозата и миРНК-ите от let-7 семейството е описана в раздел VI, точка 2.2. Чрез регулирането на *H19* и *IGLR1* членовете на let-7 семейството повлияват нормалното развитие на ендометриума и са един от механизмите за развитие на ендометриоза-асоцииран инфертилитет (379). Освен като двигатели на процеса на развитие на болестта и усложненията й, **let-7f** е проучван и поради взаимодействието му с *KRAS* и възможната асоциация с отговора към ароматазни инхибитори при пациентки с ендометриоза (408). Представителите на let-7 семейството се асоциират с потискане на туморния растеж (409). Понижената експресия в ендометриозна тъкан инхибира тази функция и води до активиране на растежа, в случая на ендометриозните лезии. Тези резултати, получени от миши модели, отговарят напълно на резултата от настоящото проучване.

Информацията за индивидуалните миРНК-и е важна за разбиране на тяхната функция и търсене на връзката между таргетираните от тях гени и развитието на патологичния процес. За точно характеризиране на настъпващите в ектопичния ендометриум промени, които го карат да придобие функции, нехарактерни за нормалния ендометриум, е необходим интегриран анализ на миРНК-ите с най-значима експресионна разлика. След извършване на анализ за комбинираният ефект на четирите миРНК-ите с най-значима разлика в експресията се излъчиха общите KEGG метаболитни пътищата, в които

участват. На Фигура 18 са представени десетте KEGG метаболитните пътища с най-голямо значение за патологичните промени.

KEGG анализът показва ключова роля на пътища, свързани с канцерогенеза и възпаление в патогенезата на ендометриозата. Взаимодействието на гените, таргетирани от четирите миРНК-и, има най-голямо отражение върху нарушаване на молекулните пътища, свързани с възникването на раково заболяване. Резултатът не е изненадващ, защото отдавна се знае за общите механизми, свързващи ендометриозата и малигнените процеси. Понижената експресия на миРНК-ите резултира в специфични промени в KEGG МиРНКи при рак, KEGG молекулни пътища при рак, KEGG Протеогликани при рак и KEGG Рак на гърдата, включващи голям набор от специфични промени, включително иницииране на ЕМТ, клетъчна миграция, стимулиране на ангиогенезата, резистентност към апоптоза. Това означава, че в ендометриума на жени с ендометриоза настъпват промени, подобни на тази при рака, които стимулират клетките да напуснат нормалната си локализация, да инвазират друга тъкан и да се развият като лезии, но без да променят основните си характеристики на ендометриални клетки.



Фигура 17. Най-значими KEGG пътища, в които вземат участие четирите миРНКи с най-отчетлива експресионна разлика в тъканни проби между случаи и контроли

Сигналният път MAPK има важна роля в различни клетъчни функции и нарушаването му е свързано с развитие на патологични процеси при човека (410). Промяната в нормалната активност на този път в резултат на миРНК-и дерегулацията е свързана с повишена пролиферация и добро преживяване на виталните клетки от ретроградната менструация (411). Може да се предположи, че MAPK сигналният път има връзка и с болката, която се среща при жени с ендометриоза, поради функцията му да регулира сензитивността при травматични за тъканите условия (411).

Сигналният път PI3K/Akt е добре познат като основен вътреклетъчен регулатор на сигналната трасдукция, имащ важно значение за клетъчни функции като растеж, диференциация и апоптоза (412). Очаквано е отклонението от нормалната му функция да доведе до развитие на пролиферативни заболявания, каквото е и ендометриозата. Като се вземе предвид факта, че PI3K/Akt сигналният път може да се повлияе от естроген, е основателно да се предположи, че дерегулацията на този KEGG път е един от факторите за прогресиране на ендометриозата (412).

Три от десетте най-значимо засегнати KEGG пътища са свързани с инфекциозни заболявания. Връзката между тях и ендометриозата може да бъде разглеждана двустранно – от една страна възпалителните промени, свързани с инфекциозния процес, да допринесат за по-благоприятна среда за развитие на ендометриозни лезии, а от друга – молекулните нарушения, до които води ендометриозата, да улеснят възприемчивостта към инфекции. Ендометриумът има специфичен микробиом, който се влияе от различни инфекциозни агенти в съседните тъкани (413). Възможно е нарушените сигнални пътища в резултат на вирусните инфекции да променят локалния имунен отговор така, че да се създадат условия за инвазия на ендометриалните клетки. От своя страна ектопичният ендометриум, притежавайки нехарактерни за еутопичния такъв промени на молекулно ниво, може да измени локалното състояние на имуната система така, че да намали потенциала й за борба с вирусни причинители. Вече има доказателства за по-голяма честота на някои инфекции при жени с ендометриоза, но са необходими по-подробни проучвния за доказване на точната връзка между двете заболявания (413).

Отдавна се знае, че ендометриозата е хронично възпалително заболяване, а оксидативният стрес е един от двигателите на локалната и системна възпалителна реакция. Кръвта, идваща с ретроградната менструация и засилената перитонеална продукция на реактивни кислородни радикали са промотори на оксидативния стрес (413). Атеросклерозата също е смятана с хронично възпалително заболяване, дължащо се на повишен оксидативен стрес. Основни негови причинители са повишените нива на липопротеини с ниска плътност и хипертонията, които оказват стресов ефект върху стените на кръвоносните съдове (413). През последните години са събрани данни за определени кардио-васкуларни промени при жени с ендометриоза (414). Тези предположения се базират основно на идеята за общите механизми, които задвижват патологичния процес при двете състояния. Освен това, ендометриозата не е заболяване, ограничено само в малкия таз, а се характеризира със системна възпалителна реакция. Въпреки, че ендометриозата засяга млади жени, при които не се очакват значими кардио-васкуларни нарушения, повишеното ниво на инфламаторни маркери, нарушава нормалната васкуларна реактивност (415). Това резултира в постепенно повишаващо се ниво на функционална ендотелна увреда, много преди появата на структурни аномалии в съдовете (415).

Резултатите от нашето проучване ясно показват, че на молекулярно ниво има значима разлика между ектопичния ендометриум на пациентки и еутопичния ендометриум на контроли. Промяната в миРНК експресионния профил води до характерни нарушения на определени метаболитни пътища. Нашето проучване показва, че детектираните промени са резултат от изменения, движещи процесите на канцерогенеза, отговор на организма срещу вирусни причинители и повишен оксидативен стрес, увреждащ съдовете. Това дава основание да се предположи, че ендометриозата възниква по механизъм, сходен на раковия, без да се променя морфологичния строеж на ендометриозните клетки. Едновременно с това, локални ендометриални промени, повишават нивото на провъзпалителните медиатори и свободните кислородни радикали, които водят до системно хронично възпаление, ендотелна увереда и чувствителност към оксидативен стрес. Тези изменения от своя страна повишават риска от развитие на инфекциозни заболявания, автоимунни състояния и атеросклероза.

4. Заключение и бъдещи насоки

Ендометриозата продължава да бъде сериозен проблем за съвременното общество. Засягайки една от десет жени по света, тя представлява предизвикателство за болните, техните семейства, лекуващите лекари и здравните системи. Съвременната наука дава възможност за разкриване на тайните на това заболяване чрез активна работа върху всеки аспект от него, но за съжаление голяма част от тях остават неразкрити. Настоящият научен труд се фокусира върху три основни направления, свързани с ендометриозата – клинична изява, диагностициране и патогенеза.

Към момента класифицирането на ендометриозата се базира само на оперативната находка, а отдавна известен факт е, че няма пряка корелация между тежестта на симптомите и стадия на болестта. Това налага нуждата от допълнително субкласифициране на засегнатите пациентки. Разработеният клиничен въпросник, съобразен с изискванията на WERF, осигурява възможност за характеризиране на болните по общоприети стандарти. Внедряването в практиката на въпросника е начин за унифициране на клиничните данни на пациентките, което е ключ към обогатяване на знанието за ендометриозата и перспектива за участие в международни работни групи.

Симптомите на ендометриоза могат сериозно да засегнат качеството на живот на болните, което се потвърждава и от нашето проучване. Тяхната вариабилност и неспецифичност са една от причините за забавяне на диагнозата с години, което резултира в прогресия на болестта и намаляване на шансовете за успешна бременност. Поради това нуждата от неинвазивен биомаркер е все по-наложителна. Към момента „златен стандарт“ в диагностицирането на болестта е лапароскопската интервенция. Настоящата дисертация разглежда възможността за използването на миРНКите като неинвазивен диагностичен и прогностичен биомаркер за ендометриоза. Сравнението между пациентки в ранен и напреднал стадий на болестта спрямо контроли, както и между двата стадия, показа значима разлика в миРНК експресионният профил в плазма. Резултатите показват, че индивидуалните миРНК-и не са подходящи за използване като биомаркер и затова е предложен панел от десет миРНК-и с най-отчетлива разлика в експресията. Той може да бъде използван като диагностичен и прогностичен маркер, тъй като подбраният

набор от миРНК-и, включва такива с разлика между случаи и контроли и между пациенти в отделните стадии на ендометриоза.

Основният проблем в трудностите при диагноза, проследяване и лечение на ендометриоза е все още неизяснения патогенетичен механизъм на болестта. Теорията на ретроградната менструация е единствена общоприета към момента, но дори и тя не успява да отговори на въпроса защо само при около 10% от жените, имащи ретроградна менструация, се развива ендометриоза. Това е причината науката да продължава да търси точния механизъм на възникване на заболяването. Настоящата научна разработка предлага миРНК-ите като потенциален ключ към разбирането на етиопатогенезата на ендометриозата. Чрез изследването на миРНК експресионния профил в ендометриална тъкан от пациентки и контроли, се доказаха четири миРНК-и с отчетлива разлика в експресията. Интегрираният анализ на техните таргети и пътищата, в които участват, показа, че общата им функция е свързана с механизмите за възникване на канцерогенеза, вирусни заболявания и атеросклероза. Този резултат показва, че ендометриозата се проявава и прогресира по механизма раковите заболявания, без да настъпва морфологична промяна в клетките, с развитие на локална и системна възпалителна реакция, подобна на тази при вирусни инфекции и повишени нива на оксидативен стрес, увреждащ ендотела.

Резултатите от настоящия дисертационен труд показват потенциала на миРНК-ите в процеса на разбиране на фините механизми, движещи ендометриозата, и валидирането на неинвазивни биомаркери. Проучванията върху по-големи кохорти, индивидуалното тестване на миРНК експресията, както и прилагането на NGS технологии, ще даде още повече информация и ще даде възможност за използването на получените резултати в практиката.

V. Изводи

1. Данните от разработения въпросник не доказват зависимост между характеристиките на менструалния цикъл и възникването на

ендометриоза и не се открива повишен риск от спонтанни аборти при жени с ендометриоза.

2. Установи се значима разлика в експресионните нива на плазмените миР-21, миР-26b, миР-18a, let-7a, миР-195, миР-106b, миР-93, миР-20a и миР106a миР-17 между пациентки и контроли.
3. Доказа се значима разлика в експресията на плазмени миРНК-и между ранен и късен стадий на ендометриоза.
4. Установи се значима разлика в експресионните нива на миР-200c, миР-196b, миР-21 и let-7f между ектопичен ендометриум на пациентки с ендометриоза и еутопичен на здрави жени.
5. Доказа се значима разлика в експресията на тъканни миРНК-и между ранен и късен стадий на ендометриоза.
6. Не се установи корелация между експресията на миРНК-ите в кръвна плазма и ектопичен ендометриум.

VI. Приноси

Приноси с научен характер

1. Предложен е панел от десет плазмени миРНК-и (миР-21, миР-26b, миР-18a, let-7a, миР-195, миР-106b, миР-93, миР-20a и миР-106a миР-17) с потенциал да се използва като биомаркер за неинвазивно диагностициране и стадиране на ендометриоза.
2. Чрез биоинформатичен анализ са селектирани десетте най-значимите KEGG пътища, в които вземат участие дерегулираните миРНК-и в ектопичен ендометриум, асоциирани с рак, вирусни заболявания и атеросклероза.

Приноси с приложен характер

1. Разработен е въпросник за клинично характеризиране на пациенти в различен стадий на ендометриоза, съобразно ръководството на Световната фондация за проучвания върху ендометриозата. Всички

пациентки, взели участие в проучването, са детайлно клинично охарактеризирани.

2. Създадена е РНК банка от кръвна плазма и ектопичен ендометриум от пациентки с ендометриоза в различен стадий и от кръвна плазма и еутопичен ендометриум от контролна група, която е база за бъдещи изследвания в областта.
3. Създадена е ДНК банка от кръвна плазма от пациентки с ендометриоза в различен стадий, която е база за бъдещи изследвания в областта.

VII. Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд

Научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. Victoria Spasova, Vesela Karamisheva, Zora Hammoudeh, Olga Antonova, Savina Hadjidekova, “MiRNA expression profile in an ectopic endometrium of patients at different stage of endometriosis”, Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences (под печат)
2. Спасова В., Карамишева В., Хаджидекова С., Станева Р., Тончева Д., Колева Л., Начев А. „Генетични биомаркери за диагноза на ендометриоза и ендометриоза-асоцииран рак на яйчника.“, „Акушерство и гинекология“, Брой 57(3)‘2018 стр.25-31
3. В. Спасова, Л. Колева, С. Хаджидекова, В. Карамишева, “Хемоперитонеум по време на бременност в резултат на руптура на ендометриозна киста”, “Спешна медицина“, 23 (3-4), 2020, стр. 206-208
4. Спасова В., Карамишева В., Колева Л., Хамуде З., Станева Р., Антонова О., Тончева Д., Колев А., Хаджидекова С., „МиРНКи: Нови възможности за откриване на ендометриоза– собствено проучване и кратък обзор на проблема“, „Акушерство и гинекология“, Брой 59(4), 2020 стр. 3-6
   Evgeni Grigorov, Savina Hadjidekova, Chavdar Slavov & Draga Toncheva “Expression profiling of muscle invasive and non-invasive bladder tumors for biomarkers identification related to drug resistance, sensitivity and tumor

6. Виктория Спасова, Весела Карамишева, Алън Начев, Лилия Колева, Юрий Тодоров, Драга Тончева, “Клиничен случай - гигантска лейомиома, маскирана като малигнен яйчников тумор”, “Редки болести и лекарства сираци”, 2020,

7. Спасова В., Карамишева В., Станева Р., Хаджидекова С., Антонова О., Колева Л., Тончева Д., “Ендометриоза – преглед на съвременните възможности за лечение и контрол на заболяването”, Годишник по болнична фармация, V, 2019, № 1, 27-36

Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд

1. V. Spasova, V. Karamisheva, O. Antonova, Z. Hammoudeh, L. Koleva, R. Staneva, M. Ganev, D. Nesheva, A. Nachev, D. Toncheva, S. Hadzhidekova, „Identification of plasma miRNAs associated with endometriosis in Bulgarian patients “, ESHG 2020.2 – Live in your livingroom
2. V. Spasova, V. Karamisheva, O. Antonova, Z. Hammoudeh, L. Koleva, R. Staneva, M. Ganev, D. Nesheva, D. Toncheva, S. Hadzhidekova, “The role of miR 196b in the pathogenesis of endometriosis”, ESHG 2021 Virtual Conference
3. V. Spasova, V. Karamisheva, R. Staneva, Z. Hammoudeh, L. Koleva, A. Nachev, O. Antonova, S. Hadjidekova, D. Toncheva, “MicroRNAs: Novel diagnostic and prognostic biomarker for multiple human diseases”, SGIP 2019 – Първа награда за постер
4. V. Spasova, S. Hadjidekova, O. Antonova, V. Karamisheva, D. Toncheva, Z. Hammoudeh, R. Staneva, „Retrospective study of searching for a non-invasive biomarker for the diagnosis of endometriosis “, SGIP 2018

5. V. Spasova, Z. Hammoudeh, V. Karamisheva, L. Koleva, A. Nachev, D. Toncheva, “MiRNA-based therapeutics: New era in personalized treatment”, Second Balkan Conference on Personalized Medicine.

VIII. Благодарности

Удоволствие е да изкажа благодарност на всички хора, без които тази дисертация нямаше да бъде реалност. На първо място това са научните ми ръководители. Благодаря на проф. Хаджидекова за подкрепата, доверието и затова, че е мой учител и вдъхновител още от студентските ми години. Благодаря на проф. Тончева за полезните насоки и помощта при написването на този труд и за свободата да избера насоката на своята работа. Благодаря на д-р Антонова за професионализма, за споделените опит и знания, за стимула, който ми дава да вървя напред. Благодаря на д-р Станева, че винаги има отговор на всеки мой въпрос и ме учи да бъда по-добър лекар и генетик. Благодаря на Зора Хамуде за търпението и времето, което отдели, за да ми помага на всеки етап от експерименталната работа. За мен е истинска чест, че имам възможност да работя с хора като вас!
Благодаря на доц. Карамишева и д-р Колева за помощта в набирането на пациентките и прекрасната съвместна работа.
Благодаря на Мария, Криси, Димето, Ася, Магдалена, Ангел, Мишо, Петър, Емо, Иво и всички останали прекрасни хора около мен за хилядите споделени моменти. Късметлийка съм, че ви имам в живота си!
Благодаря на семейството си за разбирането и вярата в мен. Благодаря на дядо ми затова, че възпита у мен всяко добро качество, което притежавам.
Благодаря на Марио за търпението и обичта!

IX. Summary

MiRNA expression profiling of different endometriosis stages

Endometriosis is defined by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. It is a chronic estrogen-dependent disease that affects 1 in 10 women worldwide. The development of endometriosis involves interacting immunologic, hormonal, genetic, and angiogenic processes, but the exact pathogenetic mechanism of the disease remains elusive. Lack of noninvasive tool for diagnosis and nonspecific disease symptoms result in delayed time to diagnosis and major public health care costs. MicroRNAs (miRNAs) are very attractive as potential biomarkers for various disorders, including endometriosis. Moreover, imbalance between miRNAs and their target mRNAs initiates pathological changes which may

contribute to the development of endometriosis. This thesis aims at three main points concerning endometriosis – clinical manifestations, diagnosis and pathogenesis.

Currently the best known classification of endometriosis is the r-ASRM score which provides morphological description of lesions during surgery. It is well known that the severity of symptoms does not always correspond to the r-ASRM score. Consequently, a good clinical characterization is needed for developing subclassification of the disease and for better understanding of its manifestations. The development of a questionnaire according to the WERF guidelines helps in advancement of endometriosis research.

The lack of a pathognomonic symptom of endometriosis and the need for laparoscopic surgery for establishing the diagnosis result in diagnosis delay for 7-11 years. That is why the need for noninvasive biomarker is urgent. Our study shows significant difference in circulating miRNA expression profile between women with and without endometriosis, as well as between women with endometriosis at different stage. We found a significant increase in the expression level of ten miRNAs (miR-21, miR-26b, miR-18a, let-7a, miR-195, miR-106b, miR-93, miR-, and miR-106a miR-17) and we nominated them as a potential diagnostic and prognostic biomarker panel for endometriosis.

The difference on molecular level between the ectopic endometrium of women with endometriosis and the eutopic endometrium of a control group of women may be the key for unrevealing the mystery of endometriosis. We compared miRNA expression profile of both tissues and the results showed four miRNAs (miR-200c, miR-196b, miR-21, and miR-7f) with a significant difference between them. The following bioinformatics analysis detected top KEGG pathways controlled by those miRNAs. The pathways are involved in the development of cancer, viral infections and atherosclerosis. That is why we postulated the pathologic process in endometriosis is driven by changes similar to those in cancer without morphological cell alterations. Moreover, it includes immunological reaction and increased oxidative stress levels that cause show close associations with viral infections and endothelial damage.

Ендометриозата се дефинира като наличие на ендометриални жлези и строма извън границите на маточната кухина. Тя е хронично естроген-зависимо заболяване, което засяга 1 от 10 жени в световен мащаб. Развитието на болестта е свързано с имунологични, хормонални, генетични и ангиогенни фактори, но точният механизъм на появата й все още не е изяснен. Липсата на

неинвазивен метод за диагноза и неспецифичният характер на симптомите водят до забавяне във времето за диагностицирането и повишаване на разходите за лечение. МикроРНК-ите (миРНК) са се превърнали в обещаващ потенциален биомаркер за различни заболявания, в това число и ендометриоза. Също така, дисбалансът между миРНК-ите и таргетните им иРНК-и води до патологични промени, които вероятно допринасят за развитието на ендометриозата. Настоящият дисертационен труд се фокусира върху три основни направления, свързани с ендометриозата – клинична изява, диагностициране и патогенеза.

Към момента класификацията на ендометриозата се осъществява чрез r-ASRM системата и се базира на оперативната находка. Отдавна е известен фактът, че тежестта на симптомите не корелира със стадия на болестта. Поради това е необходимо добро клинично охарактеризиране на болните с цел допълнителното им субкласифициране и по-детайлното познаване на изявата на заболяването. Разработеният въпросник според изискванията на WERF е добър инструмент за напредъка на изследванията върху ендометриозата.

Липсата на патогномоничен симптом на болестта и нуждата от лапароскопия за потвърждаване на диагнозата резултира в забавяне на диагнозата средно с 7-11 години. Това налага спешната необходимост от неинвазивен биомаркер. Нашето проучване показва значима разлика в миРНК експресионния профил в плазма между жени със и без ендометриоза, както й между жени с ендометриоза в различен стадий. Със значимо повишени нива на експресия са детектирани десет миРНК-и (миР-21, миР-26b, миР-18a, let-7a, миР-195, миР-106b, миР-93, миР-20a и миР-106a миР-17) и са номинирани като потенциален прогностичен и диагностичен биомаркерен панел.

Разликите между ектопичния ендометриум на жени с ендометриоза и еутопичния ендометриум на контролна група жени на молекулярно ниво могат да се окажат ключ към разгадаване на мистерията на ендометриозата. Сравнявайки миРНК експресионният профил между двата вида тъкан, ние детектирахме четири миРНК-и (миР-200c, миР-196b, миР-21 и let-7f) със най-отчетлива експресионна разлика. Последващият биоинформационен анализ показа най-значимите KEGG пътища, които се контролират от тези миРНКи. Тези пътища са свързани с развитието на рак, някои вирусни инфекции и

атеросклероза. Това е причината да предположим, че развитието на ендометриозата е процес, подобен на раковия, без да настъпват морфологични клетъчни изменения. Освен това, този процес включва имунологична реакция и повишени нива на оксидативен стрес, показващи асоциация с вирусни инфекции и ендотелна увреда.