МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

Д-Р ВИКТОРИЯ ЛАЗАРОВА СПАСОВА

МИКРОРНК ЕКСПРЕСИОНЕН ПРОФИЛ НА ЕНДОМЕТРИОЗА В РАЗЛИЧЕН СТАДИЙ

Д И С Е Р Т А Ц И Я

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

София, 2021

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 ми за разбирането и вярата в мен. Благодаря на дядо ми, че възпита у мен всяко добро качество, което притежавам.

Благодаря на Марио за търпението и обичта!

Съдържание

Използвани в текста съкращения vi
Списък на фигурите в текста viii
Списък на таблиците в текста viii
Списък на приложенията ix
I. Въведение 1
II. Литературен обзор 3
1. Ендометриоза 3
1.1 Определение 3
1.2 Исторически данни 3
1.3 Епидемиологични данни 5
1.4 Класификация 6
1.5 Етиология и патогенеза 9
1.5.1 Теория на ретроградната менструация 9
1.5.2 Теория на целомната метаплазия 10
1.5.3 Теория на стволовите клетки 10
1.5.4 Хормонални промени 11
1.5.5 Имунологични нарушения 12
1.5.6 Локални и системни промени 13
1.5.6.1 Еутопичен ендометриум 13
1.5.6.2 Перитонеална течност 13
1.5.6.3 Периферна кръв 14
1.5.7 Генетика на ендометриозата 14
1.5.8 Епигенетика и микроРНКи (миРНКи) 15
1.6 Клинична изява 16
1.7 Методи за диагностика 17
1.7.2 Клиничен преглед 17
1.7.3 Образни изследвания 17
1.7.4 Лапароскопия 18
1.7.5 Неинвазивни биомаркери 18
1.7.5.3 Раков антиген-125 (Cancer antigen-125, CA-125) 19
1.7.5.4 Други неинвазивни биомаркери, изследвани в кръв, тъкан и урина 20
1.7.5.5 МикроРНК 21
1.8 Лечение 21
1.8.2 Лечение на болката 22
1.8.3 Лечение на инфертилитета 23
2. МиРНК 24

2.1 Определение 24
2.2 Исторически данни 24
2.3 Номенклатура 25
2.4 Геномна локализация и транскрипция на миРНК 25
2.5 МиРНК биогенеза 26
2.5.1 Каноничен път на биогенеза 26
2.5.2 Неканоничен път на биогенеза 27
2.6 МиРНК-регулирано инхибиране на генната експресия 27
2.7 Алтернативно повлияване на генната експресия от миРНК-и 28
2.8 МиРНК циркулация 29
2.9 МиРНК таргетна идентификация 30
2.9.1 Таргетна идентификация, базирана на биоинформационни технологии 30
2.9.2 Таргетна идентификация, базирана на биохимичен анализ 31
2.9.3 Таргетна идентификация, базирана на транскриптомен/протеомен анализ 31
2.10 Методи за миРНК експресионно профилиране 31
2.11 Приложение на миРНКи 32
2.11.1 Патогенетична основа на заболявания 33
2.11.2 Диагностични биомаркери 34
2.11.3 Прогностични биомаркери 35
2.11.4 Терапевтично приложение 36
3. МиРНК – приложения в сферата на ендометриозата 36
3.1 Експресионно профилиране миРНКи в тъканни проби 37
3.2 Експресионно профилиране на циркулиращи миРНКи 40
3.3 Органичения в приложението на миРНКи 42
3.4 Перспективи пред приложението на миРНКи 43
III. Цел и задачи 44
IV. Материали и методи 45
1. Материали 45
1.1 Участници в проучването 45
1.2 Биологични проби 46
1.2.1 Кръвни проби 46
1.2.2 Тъканни проби 47
2. Методи 47
2.1 Клиничен въпросник 47
2.2 Изолиране на ДНК и РНК от кръвните проби 47
2.1.1 Техника на изолиране на РНК 48

2.1.2 Техника на изолиране на ДНК ... 49
2.2 Изолиране на РНК от тъканните проби ... 51
2.3 Създаване на РНК биобанка ... 54
2.4 Създаване на ДНК биобанка ... 54
2.5 Формиране на клинични групи и сборни проби ... 54
2.6 Обратна транскрипция на сборните проби ... 56
2.7 Експресионен анализ на зрели миРНК ... 57
2.7.1 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от RT-PCR върху миРНК чипове ... 60
2.7.2 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНКи от тъкан с RT-PCR върху миРНК чипове ... 61
2.8 Анализ на данните ... 62
2.9 Таргетна и онтологична идентификация ... 63
V. Резултати ... 65
1. Въпросници за клинично характеризиране на пациенти в различен стадий на ендометриоза, съобразно ръководството на WERF ... 65
1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони ... 65
1.2 Бременност и фертилитет ... 68
1.3 Болка ... 69
1.4 Медицинска история ... 70
1.5 Вредни навици ... 72
2. Изолиране на ДНК от плазмени проби и създаване на ДНК банка ... 73
3. Изолиране на РНК от плазмени и тъканни проби и създаване на РНК банка ... 74
4. Експресионен анализ ... 76
4.1 МиРНК експресионен профил в плазма ... 76
4.1.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група ... 76
4.1.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група ... 78
4.1.3 Сравнение между двата стадия ... 80
4.2 МиРНК експресионен профил в тъкан ... 82
4.2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група ... 82
4.2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група ... 83
4.2.2 Сравнение между двата стадия ... 86
5. Биоинформационният анализ ... 87
VI. Обсъждане ... 91
1. Обсъждане на резултатите от клиничното характеризиране на пациентите в различен стадий на ендометриоза ... 91
1.1 Възраст, характеристики на менструалния цикъл, прием на хормони ... 91

1.2 Бременност и фертилитет 92
1.3 Болка 93
1.4 Медицинска история 94
1.5 Вредни навици 96
2. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на миРНК-и в кръвна плазма. 96
2.1 Сравнение между пациентска група в стадий I-II и контролна група 99
2.2 Сравнение между пациентска група в стадий III-IV и контролна група 100
2.3 Сравнение между двата стадия 102
3. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на тъканни миРНК-и 104
4. Заключение и бъдещи насоки 110
VII. Изводи 113
VIII. Приноси 114
IX. Приложения 115
X. Литературни източници 127
ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ 146

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

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)

Списък на фигурите в текста

Фигура 1. МиРНК биогенеза и механизъм на действие **28**
Фигура 2. Изолиране на РНК от плазма. **51**
Фигура 3. Изолиране на РНК от тъкан. **53**
Фигура 4. Дизайн на проучването от набирането на пациенти до етапа преди експресионния анализ **55**
Фигура 5. Обратна транскрипция на сборните проби. **57**
Фигура 6. Дизайн на 96-ямковата плаката за експресионен анализ **59**
Фигура 7. МиРНК експресионен анализ. **62**
Фигура 8. Процентно разпределение на приеманите хормонални препарати от жените в пациентската група **68**
Фигура 9. Пациентки, засегнати от различни прояви на болков синдром, разпределени по стадии **70**
Фигура 10. Причини за търсене на лекарска помощ при пациентките с ендометриоза в различен стадий **72**
Фигура 11. Вредни навици на пациентките с ендометриоза в различен стадий **73**
Фигура 12. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-200с **89**
Фигура 13. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-196b **89**
Фигура 14. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-21 ..... **90**
Фигура 15. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-7f **90**
Фигура 16. Разликите в експресията на миРНКите с потенциал за неинвазивен биомаркер за ендометриоза между контроли, пациенти в стадий I-II и стадий III-IV **97**
Фигура 17. Геномна локализация на миРНКите от семействата миР-17 и миР-18, включени в панела за неинвазивни биомаркери **98**
Фигура 18. Най-значими KEGG пътища, в които вземат участие четирите миРНКи с най-отчетлива експресионна разлика в тъканни проби между случаи и контроли **108**

Списък на таблиците в текста

Таблица 1. Клинична класификация на ендометриозата според Американското дружество по репродуктивна медицина **7**
Таблица 2. Кандидат-биомаркери за диагностициране на ендометриоза **20**

Таблица 3. Медикаментозна терапия на болката при ендометриоза **22**

Таблица 4. МиРНК-и с променена експресия между засегната и здрава тъкан **39**

Таблица 5. Циркулиращи миРНКи с промяна в експресията между пациентки с ендометриоза и здрави контроли **42**

Таблица 6. Събрани биологични проби **46**

Таблица 7. Пропорции на реакционната смес **60**

Таблица 8. Условия на RT-PCR реакцията **60**

Таблица 9. Данни за възраст и характеристики на менструалния цикъл в трите групи участници **66**

Таблица 10. Данни за фертилитета в трите групи участници **68**

Таблица 11. Концентрация и съотношение 260/280 за ДНК от плазмени проби **73**

Таблица 12. Концентрация и съотношение 260/280 за РНК от тъканни проби **75**

Таблица 13. Циркулиращи миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в ранен стадий на ендометриоза и здрави контроли **77**

Таблица 14. Циркулиращи миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в напреднал стадий на ендометриоза и здрави контроли **78**

Таблица 15. Промяна в експресионните нива на циркулиращите миРНК-ите между двата стадия на ендометриоза **81**

Таблица 16. Тъканни миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в ранен стадий на ендометриоза и здрави контроли **82**

Таблица 17. Тъканни миРНК-и с промяна в експресията при сравнение между пациентки в напреднал стадий на ендометриоза и здрави контроли **84**

Таблица 18. Промяна в експресионните нива на тъканните миРНК-ите между двата стадия на ендометриоза **86**

Таблица 19. Най-значими GO биологични пътища, в които участват миР-200c, миР-196b, миР-21 и миР-7f **87**

Списък на приложенията

Приложение 1. Адаптиран клиничен въпросник за пациентките, участници в проучването **115**

Приложение 2. Информация за пациента и информирано съгласие **119**

Приложение 3. Етична оценка от КЕНИМУС **122**

Приложение 4. Списък на миРНК-ите, включени в Human Serum & Plasma miRNA PCR Array **123**

Приложение 5. Списък на миРНК-ите, включени в Human miFinder miRNA PCR Array **125**

I. 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.

II. Литературен обзор

1. Ендометриоза

1.1 Определение

Ендометриозата се дефинира като наличие на ендометриум-подобна тъкан извън маточната кухина, асоцииращо се с хронична възпалителна реакция (1). Терминът произлиза от гръцки, като *endon* означава „в, във“, *metra* – „матка“, *osis* – „заболяване, състояние“ (2). Ендометриозата е доброкачествено естроген-зависимо заболяване, което се поражда първично в тазовата кухина и засяга предимно жени в репродуктивна възраст (3).

1.2 Исторически данни

„В най-напредналите стадии болестта засяга цялостното благосъстояние на жената – духът ѝ е сломен, но тя продължава да живее в страх, че болката може да се върне още по-жестока...“

Луис Бротерсън (4)

Първото детайлно научно описание на ендометриозата е направено от патолога Карл фон Рокитански през 1860 (5). Благодарение на напредъка на микроскопската техника, той успява да идентифицира абнормен растеж на подобни на ендометриум жлези и строма в няколко тъканни проби (6). Въпреки, че в своя труд фон Рокитански използва некоректния термин „цистосаркома“, за да опише находката, неговото откритие се смята за ключов момент в историята на ендометриозата (6-8). В годините преди това има немалко информация, макар и недостатъчно достоверна, за случаи на жени с ендометриоза. След откритието на фон Рокитански познанията относно ендометриозата стават по-обширни, а проучванията в областта не спират и до сега. Новите технологии, лесният достъп до информация и научният подход ни дават възможност да трупаме все повече данни за това енигматично заболяване. Наблюденията на учените в миналото от своя страна ни дават различна перспектива върху същността на ендометриозата. Освен това, историята ни доказва колко години на усърден труд са били необходими, за да достигнем до настоящото

ниво на познание на болестта. Това е причината да отделя малка част от литературния обзор на кратка история на ендометриозата.

Още от древността е известна идеята, че жените, които не се оженят и нямат деца, ще бъдат лишени от нормалната функция на утробата си – тя ще започне да се „скита“ из тялото - т.н. „скитаща утроба“ (9-11). Трудно е да се каже със сигурност кое гинекологично състояние е репрезентирала „скитащата се утроба“, но определени текстове в Хипократовия корпус навеждат на мисълта, че с голяма вероятност е ставало дума за ендометриоза. Там се споменава, че менструалната дисфункция е причина за заболяването, бременността е начин за лечение, а болката и инфертилитетът са последиците ако пациентката е оставена нелекувана (8, 12). Това е причината жените с менструални смущения да са били принуждавани да заченат възможно най-бързо (13).

През Античността се е използвал и друг термин - „маточно задушаване“, за което се смята, че е първоизточникът на добре познатата хистерия (9, 14-16). Авторите на най-подробния анализ на история на ендометриозата твърдят, че вероятно именно ендометриозата е в основата на „мистериозното“ заболяване хистерия (8). Първият, който споменава силната болка, която жените, страдащи от „маточно задушаване“ изпитват, е Платон (17, 18). След него Соран прави предположението, че възпалението в матката води до „задушаването“, а Гален предлага идеята за сраствaнето на маточните мембрани от менструална кръв като причина за състоянието (16). За съжаление, всички тези напредничави идеи остават заровени дълбоко през Средновековието, когато болестите биват отдавани на свръхестествени сили.

В края на XVII век с подновяването на интереса към патологията започва и търсенето на причина за гинекологичните болести. В своя дисертационен труд Даниел Шрьон описва „рани“ в матката, чиито симптоми напомнят много на ендометриоза (19, 20). Той споменава за подобни „рани“ и извън матката, предполагайки, че причината за тях е кръв от матката, която излиза извън пределите ѝ. Фредерик Рюйш подкрепя идеята на Шрьон за рефлукса на кръв, но според него това е възможно само при наличие на вродени утеринни малформации (21). Именно схващанията на тези двама учени са така необходимият мост между средновековните идеи за демони и вещици и модерните научни принципи.

XIX може да бъде определен като ера на откритията в гинекологията. След първите успешни оофоректомия, вагинална и абдоминална хистеректомия, идва напредъкът на група френски изследователи, които макроскопски наблюдават случаи на заболяване с характеристиките на ендометриоза (8, 22, 23). Аутопсирайки жени, починали след внезапна силна болка по време на менструация, те детектират кръв и сраствания в перитонеума (24). Най-значимият успех в изследването на ендометриозата идва с микроскопското й документиране от фон Рокитански. Съществен недостатък на неговото откритие е, че липсват достатъчно симптоматични данни и това води до години на неуспех в асоцииране на микроскопската находка с клиничните прояви (6, 8).

Следва откритието на фон Реклингхаузен относно произхода на лезиите. Неговата теория, наречена Волфова, постулира, че заболяването произлиза от грешка при формирането на ембрионалния мезонефрос (6). Само три години по-късно Кулен открива съществена грешка в гореспоменатата теория, идентифицирайки лезиите като произхождащи не от Волфовия, а от Мюлеровия канал (25).

За първи път терминът „ендометриоза“ е споменат през 1927г. от Сампсън (26). В своята статия той споделя теория си за ретроградната менструация, потвърждава, че хеморагичните яйчникови кисти спадат към същото заболяване и дава важна информация за чревната ендометриоза. Годините след това са наситени с множество открития в областта на ендометриозата – локализации на лезиите, прояви в различна възраст, етиологични теории, медикаментозна терапия, лапароскопски техники и т.н. (27-33).

Краткият исторически обзор разкрива, че ендометриозата е позната от древни времена. Хиляди учени са допринесли за всички знания, с които разполагаме днес за заболяването. Въпреки това, съществуват още много въпросителни, засягащи ендометриозата. Патогенезата, диагностиката и лечението й остават обект на много обсъждания.

1.3 Епидемиологични данни

Трудно е да се определи точната честота на ендометриозата поради данни от разнородни източници, трудности при диагностициране и дългогодишно засягане на пациентите. Консенсусно е прието, че ендометриозата засяга 1 от 10 жени в репродуктивна възраст, което означава, че близо 200 милиона жени в световен мащаб страдат от заболяването (34). Проучванията сочат, че в групата на жените с инфертилитет превалирането на

ендометриозата е между 25 и 50% (35). От своя страна 30-50% от засегнатите от болестта са с инфертилитет (35). В групата на жените, страдащи от хронична тазова болка, процентът на пациентките с ендометриоза е 50-80% (35).

Продължителността на боледуване е трудно определима и може да бъде различна при всяка пациентка. Възможно е патологичните промени да започнат още при първия мензис на момичето и да продължат дори след периода на менопауза (36, 37).

Сред рисковите фактори за развитие на ендометриоза са експозиция на диетилстилбестрол, ниско тегло при раждане, ранно менархе, кратък менструален цикъл, ниският ИТМ (индекс на телесна маса), употребата на алкохол и принадлежност към монголоидната раса (35, 38-41). От друга страна, рискът за развитие на заболяването намалява право пропорционално на броя бременности (41). Мета-анализ на данните от цялостни геномни асоциирани проучвания (genome-wide association study, GWAS) разкриват 14 полиморфизма, асоциирани с риск от развитие на ендометриоза, като повечето от тях са свързани с метаболизма на половите хормони (42).

Различни проучвания посочват повишен риск от развитие на някои заболявания при жени с ендометриоза – автоимунни, психиатрични болести, метаболитен синдром, коронарна болест на сърцето и други (43-45). Данните обаче все още са недостатъчно убедителни и има нужда от допълнителни изследвания. Потвърдена е асоциацията на ендометриозата и ендометроиден и светлоклетъчен рак на яйчника (46). Това обаче има малко влияние върху доживотния риск за развитие на рак на яйчника, който е 1,3% при жени без ендометриоза и 1,8% при засегнати жени (47).

1.4 Класификация

Ендометриозните лезии биват няколко разновидности в зависимост от тяхната локализация:

- Перитонеална ендометриоза, наричана още повърхностна, е най-често срещаната (48). Тя се локализира по перитонеалната повърхност или по серозната обвивка на органите в перитонеума. Срещат се както единични, така и клъстерни лезии (49).
- Овариална ендометриоза – в стандартния случай представлява киста, наречена ендометриома. Често в ендометриомите има съсирена и несъсирена кръв, които им придават подобна на шоколад структура и поради това са познати като

„шоколадови“ кисти. Екстремният им растеж може да доведе до руптура и съдържимото да се излее в коремната кухина (49).

- Дълбоко инфилтриращата ендометриоза (ДИЕ), наречена още *adenomyosis externa*, е най-тежката форма на болестта. Проявява се във вид на солидни нодули с размер над 0.5 см, изградени от ендометриозна, мастна и фибромускулна тъкан (49).

Лезиите биха могли да се класифицират и като тазови и извън тазови. След перитонеалната и овариалната, най-честите тазови локализации на ендометриозата са в червата и пикочния мехур (49, 50). Случаите на извън тазова ендометриоза са значително по-редки. Ендометриозната имплантация на далечни локализации като плеврална кухина, диафрагма, перикард и други води до възпаление, фиброзиране и нарушаване на нормалната анатомия (49, 51).

Най-широко използваната класификация на ендометриозата в гинекологичната практика е тази на Американското дружество по репродуктивна медицина (American Society for Reproductive Medicine, ASRM). За пръв път тя е използвана през 1979 г., като впоследствие е ревизирана два пъти. Към момента се използва ревизирана класификация на Американското дружество по репродуктивна медицина (reverse ASRM, r-ASRM) (52). Тя се базира на размера, локализацията, дълбочината на инвазия и макроскопския вид на лезиите, които се откриват при оперативна интервенция. На базата на r-ASRM ендометриозата бива четири стадия – първи стадий (с минимални поражения), втори стадий (лека), трети стадий (умерено тежка) и четвърти стадий (тежка). В Таблица 1 е представена обобщената информация относно r-ASRM (49, 52).

Таблица 1. Клинична класификация на ендометриозата според Американското дружество по репродуктивна медицина

Стадий	Локализация	Дълбочина на инвазия
Минимални поражения	Перитонеум (1–3 см)	Повърхностна
	Яйчник (<1 см)	Повърхностна
Лека	Перитонеум (>3 см)	Дълбока
	Яйчник (<1 см)	Повърхностна
	Овариални адхезии	Повърхностна
Умерено тежка	Перитонеум (>3 см)	Дълбока

Тежка	Яйчник (1–3 см)	Дълбока
	Яйчник	Плътни адхезии
	Овариални адхезии	Повърхностна
	Фалопиева тръба (<1 см)	Плътни адхезии
	Перитонеум (>3 см)	Дълбока
	Яйчник (1–3 cm)	Дълбока
	Яйчник	Плътни адхезии
	Фалопиева тръба (>2 см)	Плътни адхезии
	Пространство на Дъглас	Пълна облитерация

Гореизложената класификация е общоприета и широко използвана. Едно от ограниченията ѝ е невключването на ДИЕ. Това налага създаването на Ензианската класификация на ДИЕ (53). Използването на двете системи е трудно поради различията в критериите и локализацията на лезиите (54). Няколко години по-късно Ензианската класификация е ревизирана с цел да стане по-достъпна за използване и да се избегне разминаване с r-ASMR (54). Тя оценява само ДИЕ и е фокусирана основно върху ретроперитонеалното пространство (53). Подобрената ѝ версия е подходящ допълващ елемент към r-ASMR и има потенциал за внедряване в клиничната практика (54, 55).

Друг недостатък на r-ASMR е липсата на прогноза по отношение на фертилитета на засегнатите жени. Това налага използването на друга класификация, която да засяга този аспект на заболяването - Фертилен индекс при ендометриоза (Endometriosis Fertility Index, EFI) (56). Той има два основни критерия – анамнезата на пациентката и т.н. *„least function score”*. Анамнезата включва възрастта на жената, продължителност на инфертилитета и информация за предходни бременности. “Least function score” се определя по време на оперативната интервенция и включва оценка за функцията на яйчниците, фимбриите и фалопиевите тръби (56). В комбинация с r-ASMR резултата EFI прогнозира резултата от евентуална бъдеща бременност, настъпила спонтанно (48, 57).

Трудностите при класифицирането на ендометриозата са видни. Всяка от системите за оценка има свои предимства и недостатъци и нито една от тях не е достатъчно изчерпателно. Важно е да се подчертае, че стадият на ендометриозата не корелира с изявените симптоми, отговора към терапия или прогнозата на болните (58). В официалния

си консенсус Световната общност по ендометриоза (World Endometriosis Society, WES) препоръчва системата на r-ASRM да се използва за класификация на болестта, а Ензианската класификация и EFI да бъдат допълващ елемент, когато е необходимо (59).

1.5 Етиология и патогенеза

Ендометриозата е обект на огромен интерес от страна на научната общност. През последните 20 години са проведени множество проучвания и са събрани данни относно процесите, отговорни за развитието на болестта. Въпреки усилията от страна учените, ендометриозата все още е една недобре разбрана патология - *„Ендометриозата остава загадка, увита в мистерия в сърцето на енигма“* (60). Теориите, обясняващи патогенезата на болестта, са много, но нито една от тях не може цялостно да даде отговор на въпроса за произхода и прогресията й. Развитието на процеса включва ендокринни, имунологични, инфламаторни и ангиогенни промени (61). Остава спорен въпросът дали тези фактори са причина за появата на болестта или нейното прогресиране води до съответните нарушения (62).

1.5.1 Теория на ретроградната менструация

Теорията на Сампсън за ретроградната менструация е приета като най-вероятно обяснение за произхода на ендометриозата (63). Според нея при рефлукс на менструална кръв през фалопиевите тръби ендометриални клетки достигат до перитонеалната кухина и се имплантират. Индукцията на ретроградна менструация при различни примати, както и фактът, че ендометриозата се открива само при менструиращи видове и не се появява преди менархе потвърждават тази теория (64, 65). Освен това, проучванията сочат, че ендометриозата се регистрира по-често при жени с обструкция на половите пътища и с по-висока честота на ретроградна менструация (66, 67).

От друга страна, ретроградната менструация е сравнително често явление и трябва да има и други фактори, които да спомагат за развитието на ектопичните лезии (66). Друг проблем при тази теория е, че тя обяснява добре произхода на перитонеалната и овариалната ендометриоза, но не може да обясни възникването на ДИЕ. Тя е локализирана в мускулния слой на пикочния мехур, уретерите и гастроинтестиналния тракт и механизмът на възникването й напомня метастазирането при рака (68). Ако приемем, че ретроградната менструация е отговорна за развитието и на ДИЕ, това означава, че ендометриалните клетки попадат в кръвоносната и/или лимфната система без да се

разрушат и след това инвазират съответните органи (68). Към момента обаче липсват доказателства за такова събитие, което се случва при развитието на раковия процес.

1.5.2 Теория на целомната метаплазия

В основата на теорията на целомната метаплазия е идеята, че клетки, намиращи се извън матката, се трансформират в ендометриални клетки. Като причина за развитие на ендометриоза се посочва метаплазията на специализираните мезотелни клетки на перитонеума (69). Според тази теория остатъци от Мюлеровия и Волфовия канал се развиват като ендометриозни лезии, които отговарят на естрогенова стимулация (70). Направени са и предположения, че именно целомната метаплазия може да доведе до развитие на тежките прогресивни форми на ендометриоза (36). Пропуск на тази идея е, че ендометриозни лезии се откриват и извън локализацията на Мюлеровия канал (71). Редките случаи на заболяването преди пубертета също би могло да бъде обяснено с тази теория (72). Липсата на естроген, който стимулира растежа на лезиите в този период, навежда на мисълта, че вероятно състоянието е различно от ендометриозата при зрели жени (71).

1.5.3 Теория на стволовите клетки

Идеята за ролята на стволовите в патогенезата на ендометриозата се обсъжда все повече в последните години. Стволовите клетки са недиференцирани клетки, които могат да се диференцират в различни видове специализирана такива (73). При менструиращи жени прогениторните/стволови клетки в базалния слой на ендометриума са отговорни за регенерацията на функционалния слой всеки месец (74). Ако те се придвижат с ретроградната менструация, могат да се окажат с важна роля за развитието на ендометриозата (61).

В нормалния ендометриум се различават няколко вида мултипотентни ендометриални стволови клетки – епителни, мезенхимни и смесени (75). За съжаление, към този момент специфични маркери за епителните стволови клетки все още липсват (76-78). За разлика от тях, мезенхимните стволови клетки са изучени много добре, благодарение на определени маркери с доказана ефективност – CD_{146}, PDGFRB (β-type platelet-derived growth factor receptor) и SUSD2 (sushi domain containing-2) (79). Те са локализирани периваскуларно и са отговорни за регенерация на функционалната строма на ендометриума (68). Проучванията

показват, че те имат висок потенциал за диференциация, значителна пластичност и мултипотентност (79).

Смята се, че стволовите клетки от костния мозък също имат роля в ежемесечната регенерация на ендометриума (80). Количеството им се увеличава по време на пролиферативната фаза на месечния цикъл (68). Все още обаче липсват достатъчно доказателства за този процес и физиологичната роля на тези клетки не може да бъде потвърдена.

Тази теория може да обясни начина, по който ретроградната менструация води до развитие на ендометриоза, включително и случаите на ДИЕ и ендометриоза извън тазовата кухина. Въпреки усилената работа в областта на стволовите клетки, има нужда от още данни, за да се потвърдят тези предположения.

1.5.4 Хормонални промени

Известен е фактът, че ендометриозата е естроген-зависимо заболяване. Естрогените стимулират растежа на ендометриозните лезии, а промените в техния метаболизъм и действие, са сред причините за развитието им (3, 81). Необходимият за ендометриозната пролиферация естрадиол е с два различни произхода – системен, произвеждан от стероидогенните органи и локален, чиято продукция се дължи на повишената експресия на ароматаза и стероидогенния остър регулаторен протеин, както и на понижената експресия на 17β-хидроксистероид дехидрогеназа 2 от ендометриозните лезии (3). Експресията на естрогеновите рецептори алфа и бета (ER-α и ER-β) е различно в еутопичния и ектопичния ендометриум, като ER-β е със значимо по-високи нива в ектопичната тъкан (81-84). Деметилирането на промотора на гена, кодиращ ER-β, води до свръхекспресията на рецептора при ендометриоза, което от своя страна понижава експресията на ER-α и потиска естрадиоловата индукция на прогестероновия рецептор (PR) в ендометриозните клетки (85).

В миши подели е показано, че ER-β стимулира растежа на лезиите чрез инхибиране на тумор некрозис фактор-α (TNF-α)-индуцирана апоптоза, повишаване на нивата на интерлевкин-1β (IL-1β), стимулиране на клетъчната пролиферация и епително-мезенхимния преход (ЕМП) (86). Въпреки, че ендометриозните клетки произвеждат прогестерон на локално ниво, дефицитът на PR в ендометроидните стромални клетки води

до нарушена прогестеронова сигнализация т.н. „прогестеронова резистентност“ (87-89). Това частично обяснява защо ендометриозните лезии не се повлияват от прогестерон и агонистите му (90). От друга страна синтетичните антипрогестини взаимодействат с малкия брой PR, като потискат ендометриозата и повлияват болковия синдром (91, 92).

1.5.5 Имунологични нарушения

Съществуват множество доказателства за нарушена функция на имунната система при пациентки с ендометриоза (93, 94). Все още остава спорен въпросът дали имунните нарушения са предпоставка за развитие на болестта или са неин характерен белег (62).

Попадането на ендометриални клетки в перитонеалната кухина предизвиква възпалителен отговор, който нарушава „имунонаблюдението“ и спомага за имплантирането и нарастването на ендометриозните лезии (95, 96). Имунният отговор включва моноцити, макрофаги, еозинофили, неутрофили и Т-клетки, който биват привлечени от продуцираните от ектопичния ендометриум хемокини (97). Активността на локалните клетки естествени убийци (NK-клетки) се нарушава, което подпомага ендометриозните клетки да се „скрият“ от имунната система (98). Макрофагите в перитонеалната кухина се характеризират с намален фагоцитен капацитет, повишена активност на проинфламаторни цитокини (TNF-α, IL-1β, IL-6), растежни фактори, ангиогенни фактори и адхезионни молекули (61, 62, 94). Цитокиновата продукция се повишава и поради свръхекспресията на нуклеарен фактор капа-бета (NF-kB), производството на кислородни радикали и активацията на сигналния път на митоген-асоцииранатa киназа (MAPK) (99). Съществува и една теория, според която в хода на еволюцията хората са загубили характерната за другите примати способност имунните клетки в перитонеума да унищожават повечето формирани лезии (100).

Всички тези имунологични промени спомагат за растежа, васкуларизацията и ноцицепцията на лезиите (101). Нервните окончания в ектопичния и еутопичния ендометриум се стимулират от имунните медиатори (102). Макрофагите, колонизирали нервните влакна, успяват да ги сенсибилизират, а последващия асцендиращ сигнал до централната нервна система може да доведе до повишен отговор от ноцицепторите и променено болково възприятие (102, 103).

1.5.6 Локални и системни промени

Имунологичните, възпалени и хормонални нарушения са най-характерните промени, регистрирани при случаи на ендометриоза, като те се наблюдават в различна степен в три отделни направления – еутопичен ендометриум, перитонеална течност и кръв (104).

1.5.6.1 Еутопичен ендометриум

Въпреки, че под обикновен микроскоп еутопичният ендометриум при болни от ендометриоза и при здрави изглежда еднакъв, проучванията сочат, че между тях съществуват значими разлики на молекулно ниво (105).

Клетките от еутопичния ендометриум на жени с ендометриоза експресират по-високо ниво на информационна РНК (иРНК) за ароматаза, циклооксигеназа, PR и ангиогенни фактори (105-108). Характерна за еутопичния ендометриум при засегнати жени е нарушената регулация на интерлевкини и растежни фактори, което спомага за растежа и ангиогенезата на лезиите (3, 109, 110). Свръхекспресията на матриксните металопротеази 7 и 11 (MMP-7 и MMP-11) стимулира пролиферацията на ендотелните клетки, а повишената експресия на глутатион пероксидаза и каталаза предполага роля на свободните радикали в развитието на заболяването (104, 111).

Други промени, характерни за еутопичния ендометриум на жени с ендометриоза включват намалена експресия на левкемия инхибиращ фактор (leukemia inhibitory factor, LIF) и *HOX* гените, необходими за децидуализацията; намалена експресия на интегрин α и β, които са маркери за утеринна рецептивност; повишена експресия на фактор, свързан с ендометриалното кървене по време на имплантационната фаза; променена експресия на гени, асоциирани с клетъчно делене, имплантация и ембриотоксичност (104, 112).

1.5.6.2 Перитонеална течност

Както е описано в раздел II, част 1.5.5 ендометриозата е свързана с активиране на имунни клетки, предизвикващи възпалителна реакция. Детектираните завишени нива на проинфламаторни цитокини (IL-1β, IL-6, TNF-α) в перитонеалната течност имат роля в имплантацията и по-нататъшния растеж на ендометриозните лезии (70, 113, 114). Регистрираното повишено ниво на MMP-3 се смята за една от причините за по-лесна имплантация на лезиите (70).

1.5.6.3 Периферна кръв

В периферната кръв на жени с ендометриоза се откриват повишени нива на Т- и В-лимфоцити, както и авто- и антиендометриални антитела, което насочва към промени в клетъчния и хуморалния имунитет (115). В кръв са открити и сходни промени в проинфламаторните цитокини, каквито се наблюдават в перитонеалната течност, което пък повдига въпроса не само за локална, а и за системна възпалителна реакция, играеща роля в патогенезата на болестта (116-118).

От написаното става ясно, че много фини регулаторни механизми са нарушени при пациентки с ендометриоза. Трудно е да се даде еднозначен отговор на въпроса за произхода и развитието й, защото тя като естроген-зависимо възпалително системно заболяване води до множество промени в целия организъм. Теорията на Сампсън дава добро обяснение за възникването й, но не дава яснота защо само около 10% от жените с рефлукс на менструална кръв развиват ендометриоза. Освен описаните дотук механизми на патологичния процес е важно да се отдаде и роля на наследствеността и генетичната предиспозиция.

1.5.7 Генетика на ендометриозата

Генетична предразположеност към ендометриоза е предположена поради резултати от близначни проучвания, показващи стойност на наследственост от 50% и повишен риск за развитие на болестта при родственици от първа линия (119, 120). Ендометриозата е определена като заболяване с полигенен тип на унаследяване, като значение за възникването й имат наследствени и придобити фактори (70, 71). Цялостни геномни асоциативни анализи на семейства с множество случаи на болестта откриват два кандидат региона с редки варианти, които обаче още не са идентифицирани (121). Различни проучвания и мета анализ детектират редица сигнификантни локуси, определящи различен тип ендометриоза, както и развитие на по-напреднал стадий според rASMR (42, 61, 122).

Освен намирането на такива локуси, важно е да се определи и тяхната роля в патогенезата на ендометриозата. Анализът на гените, локализирани в тях, показва, че те са част от молекулярните пътища, асоциирани с развитието й (62). Разбира се, това не е достатъчно, за да се докаже категорична връзка със заболяването. Необходим е допълнителен анализ, който да вземе предвид данните от епигенетични, транскриптомни, метаболомни и протеомни проучвания. Необходимо е цялата тази информация да бъде интегрирана с

клиничните данни на пациентките, за да се направи фенотипно характеризиране на съответните молекулярни нарушения (62).

Интерес представляват и соматичните мутации, открити в ендометриозни лезии, които са търсени във връзка с асоциирането на някои видове рак с ендометриозата (46). Различни изследвания определят водещи („driver") мутации в *KRAS, PIK3CA, ARID1A, PPP2R1A FGFR2* в ендометриозна тъкан (123-125). За момента те не могат да бъдат използвани като прогностичен маркер за поява на заболяването или малигнизацията му, тъй като са открити в голям процент в нормален ендометриум (125).

1.5.8 Епигенетика и микроРНКи (миРНКи)

Интерес в последните години будят и епигенетичните различия, регистрирани между еутопичен и ектопичен ендометриум. Проучванията в сферата пораждат идеята, че промяната в метилационния профил на някои гени може да доведе до промяна във възпалителния отговор, клетъчната адхезия, отговорът към стероидни хормони, негативната регулация на апоптозата и активирането на MAPK (68). Сред гените с промяна в метилацията на промотора, които са предложени като фактор в развитието на ендометриозата, са *ESR1, ESR2, PGR, NR5A1, CYP19A1, HOX* клъстера и генното семейство *GATA* (82, 126-128). Предполага се, че тези гени участват в различни сигнални пътища, свързани с патофизиологични промени, характерни за появата и прогресирането на ендометриозата.

Транспортирането на миРНК-ите чрез екзозоми и микровезикули им позволява да регулират ключови функции на клетки с различна локализация чрез ендокринна и паракринна междуклетъчна сигнализация (129-131). Съществуват предположения, че миРНК-ите в кръвта и перитонеалната течност с нарушена експресия биха могли да инициират процеса на поява на ендометриозни лезии, както и да стимулират последващия им прогрес (68). Редица изследвания демонстрират различен миРНК експресионен профил между ендометриозна и здрава ендометриална тъкан (132). Например намалената експресия на миРНК-200b в ендометриозна тъкан, водеща до намалена активност на гените *ZEB1* и *ZEB2*, се свързва с инвазия и пролиферация на лезиите (133).

Описаното дотук показва колко сложен и многофакторен е процесът на възникване и прогресиране на ендометриозата. Теорията на ретроградната менструация сравнително

добре обяснява иницииращия етап на патологичния процес, но последващите промени са резултат от сложна комбинация от имунологични, генетични, епигенетични и хормонални изменения в локалната тъкан и на системно ниво. Продължаващите проучвания в областта и бъдещите открития ще ни дадат още по-ясна представа за патогенезата на болестта и ще помогнат за напредъка на диагностиката и лечението.

1.6 Клинична изява

Ендометриозата е заболяване с широк спектър на клинична изява – от напълно безсимптомно протичане до тежка болкова симптоматика, нарушаваща качеството на живот на пациентките. Класическите симптоми на ендометриоза включват дисменорея, хронична тазова болка и инфертилитет. Освен тях се срещат диспареуния, кървене след полов акт, обилно менструално кървене, дисхезия, дизурия (134, 135). Въпреки общоприето мнение, че тежестта на симптомите не зависи от стадия на болестта, някои проучвания откриват връзка между болковата симптоматика и наличието на аднексиални адхезии, ректални и вагинални инфилтрати и засягане на яйчниците (136-138). До голяма степен симптомите при ендометриоза са зависими от локализацията. Например ендометриозата на задната тазова стена често се проявява с дисхезия, а тази в ректовагиналния септум се изявява с диспареуния и тежка дисхезия (139, 140).

Жените с ендометриоза имат около 20 пъти по-голям риск да страдат от инфертилитет в сравнение с жените без ендометриоза (141). Допуска се и вероятността болестта да увеличава риска от спонтанни аборти (142). Ендометриозата е честа причина за инфертилитет/субфертилитет в някои случаи самостоятелно, а в други в комбинация с допълнителни рискови фактори (143). Механизмите, по които ендометриозата причинява трудности при забременяване не са напълно изяснени, но е потвърдено, че възможностите за репродукция намаляват десетократно при засегнати жени (144). Проучвания в областта показват намалено качество на овоцитите и ембрионите на жени с ендометриоза, но все още данните са оскъдни (145).

Морфологичните промени водят след себе си проблеми за болните от друго естество, каквито са повишеният риск от депресия, влошаването на интимните и социалните взаимоотношения, затрудненията в изпълнение на всекидневните задължения, намалена продуктивност и не на последно се повишават разходите за здравни услуги (146, 147).

1.7 Методи за диагностика

Въпреки напредъка на изследванията в областта на ендометриозата и натрупаната информация за тази патология, диагностицирането й все още е предизвикателство за специалистите. Причините за това са различни – липса на патогномоничен белег на болестта и вариабилността на симптоматиката, които определят „златният“ стандарт за потвърждаване на диагнозата да остава лапароскопията (148). В световен мащаб забавянето при поставяне на диагнозата е 7-11 години (149, 150). Това отлагане повишава значимо риска за прогресиране на заболяването, което води до влошаване на симптоматиката и намаляване на шансовете за забременяване (135, 144, 151, 152). Диагностичният процес при ендометриоза включва комбинация от инвазивни и неинвазивни процедури, всяка от които има своите предимства и ограничения.

1.7.2 Клиничен преглед

Както при всяко заболяване и в случаите на подозирана ендометриоза анамнезата на пациента е от основно значение. Разнообразието в проявените симптоми и тяхната тежест, неспецифичността им и широката диференциална диагноза налагат използването на допълнителни методи за подпомагане на диагнозата (134). Стандартният гинекологичен преглед със спекулум обикновено не показва никакви отклонения в случаи на ендометриоза (153). Бимануалната палпация би могла да покаже чувствителност и нодули в областта на утеросакралните лигаменти и пространството на Дъглас, както и маси в областта на яйчниците (154).

1.7.3 Образни изследвания

Ехографският преглед е най-достъпният и евтин начин за визуализиране на лезии в тазовата област. Използва се трансабдоминален и трансвагинален достъп. Те имат добра чувствителност за детектиране на ендометриоми, но могат да пропуснат някои локализации на перитонеалната, ДИЕ, както и налични адхезии (155, 156). Възможно е да се използва и трансректален достъп за визуализиране на ендометриоза на ректума, по задната стена на пикочния мехур, както и на ДИЕ (157).

Откриването на маса в тазовата област в част от случаите е индикация за допълнително уточняване с ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) или компютърна томография (КТ) (154). ЯМР е особено полезен в случаи на ДИЕ, ендометриоза в ректосигмоидното пространство, пикочния мехур и при необичайни локализации на лезиите (153). Високата му цена и

липсата му във всяко медицинско заведение ограничава използването му (158). КТ със и без контраст се проучва като метод за диагностика на ендометриоза, но все още не е внедрен в клиничната практика (159, 160).

1.7.4 Лапароскопия

Най-надеждният метод за потвърждение на диагнозата към момента е лапароскопска инспекция на абдоминалната кухина с последващо хистологично потвърждение на лезиите (161). Лапароскопията без хистологично изследване има значимо по-малка чувствителност. Данните сочат, че само 54-67% от лезиите, определени като ендометриозни се подлагат на хистологичен анализ, а при 18% от подозираните ендометриозни лезии не се откриват патологични изменения, характерни за болестта (162). Негативната лапароскопска диагностика (случаи, в които не се открива ендометриоза при лапароскопска процедура) е с висока точност и дава достатъчно основание да се изключи тази диагноза (163). От друга страна, позитивната лапароскопия (случаи, при които се открива ендометриоза) има значимо по-малка информативна стойност ако не бъде последвана от хистологично тестване (163).

Лапароскопията е много полезна в диагностицирането на ендометриоми (153). Проблем е тяхното отстраняване поради риск от намаляване на яйчниковия резерв и това е причина техниката да се използва с повишено внимание при жени, желаещи бременност (153). Основните негативи на лапароскопската интервенция са високата цена, рискът от адхезии и нуждата от пълна анестезия (164). Важно е да се има предвид, че независимо от локализацията и особеностите на лезиите, качеството и последиците от лапароскопската интервенция зависят най-вече от уменията на оператора (165).

1.7.5 Неинвазивни биомаркери

Американският Национален здравен институт дефинира понятието биомаркер като „параметър, който може да бъде обективно измерен и е индикатор за нормален биологичен процес, патогенетичен процес или фармакологичен отговор към терапевтична интервенция" (166). WES поставя търсенето на неинвазивен/полуинвазивен биомаркер за ендометриоза като водещ приоритет сред научната общност, работеща в сферата (167). Неинвазивен биомаркер би могъл да се търси в серум/плазма, урина, менструална кръв или вагинален секрет, а полуинвазивен в перитонеална течност или ендометриум (168, 169). Много са факторите, които налагат активно търсене и внедряване в клиничната практика

на неинвазивен или полуинвазивен биомаркер за ендометриоза – забавянето на диагнозата, липсата на патогномоничен симптом, недостатъчната чувствителност на образните изследвания, нуждата от инвазивна процедура за потвърждаване на диагнозата. Откриването на такива биомаркери ще спести хирургични интервенции на жени, които не се нуждаят от тях и ще осигури нужната процедура на жени с ендометриоза-подобни симптоми. Освен това, валидирани биомаркери може да помогнат за диагнозата в ранните етапи на болестта, което ще позволи навременно лечение и предотвратяване на прогресията.

Откриването и практическата употреба на специфичен биомаркер за ендометриоза е дълъг и сложен процес (170). Въпреки активното търсене и определне на многото кандидат-биомаркери, все още липсва достатъчно специфичен такъв, който да бъде валидиран за клинично използване (169, 171). Основна причина за това е липсата на репродуцируемост на научните изследвания. Съществен проблем на проучванията са хетерогенност на болестта и недостатъчно големия брой на участниците в изследванията (172). Към момента не съществува биомаркер с достатъчна специфичност и сензитивност, който да измести лапароскопията като метод за диагностика и стадиране на ендометриоза.

1.7.5.3 Раков антиген-125 (Cancer antigen-125, CA-125)

Гликопротеинът CA-125 е най-добре проученият маркер за ендометриоза. Детектирана е корелация между серумното му ниво и тежестта на заболяването най-вече в случаи на ендометриоза на яйчника (172-174). CA-125 не може да отрази наличието на ендометриоза във всички стадии, като има добри резултати в III-IV стадий, но доста ограничени в I-II (175). Освен това, той не е специфичен биомаркер за болестта, тъй като се открива с повишена серумна концентрация и при други състояния – рак на яйчника, маточни лейомиоми и аденомиоми, тазова туберкулоза, бременност, менструация (176).

За постигане на по-добри резултати са изследвани комбинации от CA-125 с други кръвни маркери: CA-125 + CA-19-9 + сървавин иРНК (87% чувствителност и 10% фалшиво-положителни резултати); CA-125 + хемокинов рецептор-1 иРНК + моноцитен хемоатрактант протеин-1 (92.2% чувствителност и 81.6%специфичност); CA-125 + IL-8 + TNF-α (89.7% чувствителност и 71.1% специфичност) (177-179). Необходими са още проучвания за валидиране на тези резултати.

1.7.5.4 Други неинвазивни биомаркери, изследвани в кръв, тъкан и урина

Дългогодишното изучаване на патогенетичните механизми, водещи до развитие на ендометриоза са довели до засилено търсене на неинвазивен/полуинвазивен биомаркер сред молекули, които са част от пътищата, водещи до развитие на болестта. Най-добре проучените от тях са показани в Таблица 2.

Таблица 2. Кандидат-биомаркери за диагностициране на ендометриоза

Локализация	Биологична група	Маркери	Референция
Серум/плазма	Хормони	Пролактин, лутеинизиращ хормон, естрадиол, лептин	(171)
	Растежни фактори	IGF-I, GM-CSF, TGF β1, активин	(171, 180)
	Възпалителни маркери	IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1, IFN-γ, CRP, копептин	(171, 181, 182)
	Гликопротеини	Фолистатин, гликоделин А	(171, 183)
	Маркери на ангиогенезата	VEGF, NGF, FGF-2, IGFBP-3, ангиопоетин-1 и 2, ендоглин, тромбоспондин-1,MVD	(184, 185)
	Маркери на клетъчна адхезия и инвазия	sICAM-I, MMP-2, MMP-9, интегрини	(171, 186, 187)
	Маркери на апоптозата	теломеразна активност, циклин D1, сървавин, Bcl-2, MCL-1	(188)
Тъкан (менструална кръв, ендометриум)	Хормони	CYP19, 17βHSD2, ER-α, ER-β	(189)
	Възпалителни маркери	IL-1R2	(189)
	Маркери на ангиогенезата	PROK-1	(189)
	Маркери на клетъчна адхезия и инвазия	Интегрини	(189)
	Невронални маркери	PGP 9.5, VIP, CGRP, SP, NPY, NF	(189)
	Рецепторни маркери	VDRP	(164)
Урина	Маркери за гликолиза	Енолаза 1	(164)

	Маркери на хомеостазата	Уринарни пептиди	(164)

1.7.5.5 МикроРНК

МиРНК-ите са къси некодиращи РНК-и, модулиращи генната експресия на посттранскрипционно ниво (190). Контролирайки експресията на определени гени, те са ключов регулатор на много патологични процеси, включително и ендометриоза (190). Това се определя от участието им в процесите на възпаление, ангиогенеза, аберантна клетъчна диференциация и инвазия (191). МиРНК-ите показват значителна стабилност в биологични течности и се характеризират с тъканна специфичност, което ги поставя в центъра на вниманието при търсенето на неинвазивен биомаркер за ендометриоза (192).

Различни проучвания показват миРНК-и с променена експресия при пациентки с ендометриоза (161). Семейството на миРНК-200 е едно от най-активно изучаваните за специфичен биомаркер при ендометриозата. Открити са промени в експресията на членовете му както в серум, така и в тъканни проби (193). Съществуват доказателства, че понижената експресия на миРНК-200 в ектопичен ендометриум води до ЕМП, характерен за ендометриозата (194). Друг потенциален биомаркер е миРНК-20, свързан с TNF-β и IL-8, който при понижена експресия води до повишаване на техните нива (195). Доказано е, че миРНК-143 с повишена експресия в серума на пациентки с ендометриоза асоциира с клетъчна инвазия и миграция (196).

На този етап проучванията върху миРНК-и като потенциален маркер за ендометриоза са противоречиви и липсва миРНК или панел от миРНК-и, които да са достатъчно специфични и чувствителни, за да бъдат използвани с диагностична цел. Не трябва да се пропуска и фактът, че миРНК експресията се влияе и от други заболявания и състояния (161). Това налага унифициране на изследванията с миРНК-и – използване на достоверни контроли, стандартизиран начин за екстракция и обработка на пробите, строги критерии при набиране на пациенти.

1.8 Лечение

Не съществува идеално и единствено лечение на ендометриозата, затова целта е да се постигне оптимален терапевтичен ефект, за максимално кратко време с минимални странични ефекти, с възможно най-дълъг период на ремисия и на задоволителна цена (48).

Както беше споменато в раздел II, част 1.5 все още причините, водещи до развитието на болестта, не са напълно изяснени, поради което няма възможност за етиологично лечение. Към момента терапията на ендометриоза може да бъде медикаментозна, хирургична или комбинация от двете и е насочена към лечение на болката и инфертилитета (197). Особеностите на болестта налагат фармакологичното лечение да е насочено не към излекуване, а към потискане на ендометриозата. Поради това, нуждата от нови възможности за лечение е все по-належаща (48).

1.8.2 Лечение на болката

Както вече стана ясно, ендометриозата е естроген-зависимо заболяване и следователно хормоналната супресия е основният начин за купиране на симптоматиката (165). Различните класове лекарства имат сходна ефективност и всички те имат странични ефекти, а основните разлики са в индивидуалната толерантност и цената на препаратите (165). В Таблица 3 са описани различните класове лекарства, които се използват за лечение на болката, техни представители и важни кратка информация за всеки от класовете. Информацията е взета и модифицирана от Основни препоръки на Европейското дружество по човешка репродукция и ембриология (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) (165).

Таблица 3. Медикаментозна терапия на болката при ендометриоза

Лекарствен клас	Медикаменти	Информация
Хормонални контрацептиви	▪ Етинилестрадиол/дезогестрел ▪ Етинилестрадиол/гестроден ▪ Етинилестрадиол/етаногестрел (вагинален пръстен) ▪ Етинилестрадиол/7-диацетилноргестимат (трансдермален пластир)	▪ Комбинираните орални контрацептиви (КОК) намаляват дисменореята, диспареунията и тазовата болка, асоциирана с ендометриоза. ▪ КОК могат да се използват продължително за лечение на дисменорея.
Прогестагени и	▪ Медроксипрогестерон ацетат ▪ Ципротерон ацетат ▪ Дезогестрел	▪ Препаратите имат добър ефект в справянето с ендометриоза-асоциираната болка.

антипрогестагени	▪ Диеногест ▪ Левоноргестрел интраутеринна спирала	▪ Трябва да се имат предвид страничните ефекти, които могат да настъпят.
Аналози на гонадотропин–освобождаващия хормон (GnRH-a)	▪ Госерелин ▪ Нафарелин ▪ Трипторелин ▪ Леупролид	▪ Препоръчва се използването им за лечение на болката, но все още няма ясни данни за точната доза. ▪ Да се комбинират с терапия за хипоестрогенизъм, който настъпва при използването им. ▪ Внимание при млади жени поради незавършено уплътняване на костите.
Ароматазни инхибитори	▪ Летрозол ▪ Анастрозол	▪ Препоръчват при болки от ректовагинална ендометриоза в случай, че няма отговор от друго лечение.
Аналгетици	▪ Напроксен ▪ Рофекоксиб	▪ Липсват достатъчно проучвания за ефективност

За справяне с болката спомага и оперативната интервенция (лапароскопия/лапаротомия). Лапароскопската операция се предпочита поради по-краткия болничен престой и по-лесното възстановяване. Ексцизията на ендометриозните лезии доказано води до намаляване/изчезване на болковата симптоматика (165). Утеросакралната нервна аблация не се препоръчва като допълнителна процедура по време на оперативната интервенция поради липса на данни за ефективност (165). Тоталната хистеректомия се препоръчва на жени, които нямат планове за репродукция само при условие, че разбират, че това невинаги води до лечение на болката (165).

1.8.3 Лечение на инфертилитета

Стандартно прилаганата медикаментозна терапия за лечение на ендометриоза не е ефективна за лечение на инфертилитета и не трябва да се прилага, когато това е

единствено показание. Това важи предимно за леките форми на болестта. Липсва достатъчно информация за тежките (165).

При жени, страдащи от ендометриоза-асоцииран инфертилитет оперативното инцизиране на лезиите дава най-добър резултат за увеличаване на вероятността за забременяване (165).

Всяка година се публикуват над 300 научни труда, засягащи различни аспекти на ендометриозата (48). Въпреки огромното количество информация, която ни дават, въпросите свързани с това заболяване остават. Все още няма ясна представа какъв е етиопатогенетичния механизъм, който е причина за появата и прогресията на заболяването. Осезаема е липсата на биомаркер, който да спомага за диагностициране, стадиране и проследяване на пациентки с ендометриоза. Съществен проблем остава и лечението на болестта, която към момента остава хронична и неподдаваща се на ултимативно лечение. Една от най-перспективните възможности за изясняване на неизвестните около ендометриозата са миРНК-ите.

2. МиРНК

2.1 Определение

МиРНК-ите са малки, едноверижни, консервативни, некодиращи РНК молекули, които регулират генната експресия на посттранскрипционно ниво (198). Средната им дължина е 22 нуклеотида и се откриват при повечето еукариоти, включително и при човека (198, 199). Според последната версия на миРНК базата данни (miRBase Sequence Database release 22) общият брой на откритите РНК-и е около 48000, а тези при човека са над 2600. Повече от половината от човешките гени се регулират от миРНК-и, което ги прави есенциални за голяма част от физиологичните и патологични процеси в организма (200).

2.2 Исторически данни

В началото на 80-те години на миналия век е открит генът *lin-4*, чиято функция е регулацията на темпоралното развитие на ларвите на нематода *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (201). Няколко години по-късно е установено, че мутацията в *lin-4* се проявява фенотипно противоположно на мутацията в друг ген - *lin-14* (202). Ключовото откритие, че *lin-4* не кодира протеин, а малка некодиращата РНК, е направено от Аброс, Лий и Файнбаум през 1993 г. (203). Същият екип успява да докаже, че *lin-4* РНК се свързва комплементарно с 3`-нетранслиращия район (untranslated region, UTR) на *lin-14* и това

води до намалено производство на протеина lin-14 без промяна в нивото на *lin-14* иРНК (203). Всичко това дава повод да се предположи, че *lin-4*, свързвайки се с 3`-UTR на *lin-14* иРНК, причинява репресия на експресията й на посттранскрипционно ниво (204). За известен период от време се е смятало, че миРНК-ите са специфични за *C. elegans*, но по-късно се доказва ролята им при много видове, включително и при човека (205, 206). Това откритие революционизира молекулярната биология и поставя началото на поредица от проучвания, засягащи миРНК-ите. Техният начин на регулация на генната експресия вече е добре познат, а нови миРНК-и продължават да се детектират и днес (199).

2.3 Номенклатура

Съгласно съществуващата система за номенклатура миРНК-ите получават своите наименования след експериментално потвърждение (207, 208). За означаване на миРНК-и се използва представката „миР“, следвана от тире и число, което съответства на последователността на откритие на конкретната миРНК (207). Главната буква в приставката означава, че се касае за зрялата форма на миРНК, а с „мир“ се означава при- или пре-формата (209). Името на гените, кодиращи съответните миРНКи, се отбелязват със същата представка, но се използва наклонен шрифт. Видът, за който е характерна миРНК, се бележи с трибуквена представка пред миР, когато става въпрос за вида *Homo sapiens* се използва съкращението hsa (например hsa-миР-200).

МиРНК-и с разлики в секвенцията от един или два нуклеотида се означават с малка буква след цифрата (например миР-200a, миР-200b) (208). В случаите, в които при-, пре-миРНК или гени, локализирани на различни места водят до идентични зрели миРНКи, се добавя още едно тире, следвано от съответния номер (например пре-миРНК-ите hsa-мир-194-1 и hsa-мир-194-2 водят до зрялата hsa-миР-194) (113). Две миРНК-и, произхождащи от една и съща пре-миРНК и произведени в приблизително еднакво количество, се отбелязват с наставките -3p и -5p (208).

2.4 Геномна локализация и транскрипция на миРНК

Много от гените за миРНК-ите са разположени в интергенните райони на ДНК и единствен техен продукт е миРНК (210). Други са локализирани в интроните или UTR на протеин-кодиращи гени (210). Рядко миРНК гените се разполагат в екзоните, като в такива случаи миРНК генът се транскрибира заедно с протеин-кодиращия ген (211).

Ензимът РНК полимераза II е отговорен за транскрипцията на миРНК гените в при-миРНК - първичен транскрипт със специфична stem-loop структура (212). Процесът на зреене на при-миРНК-ите е сходен с този на протеин-кодиращите транскрипти – те подлежат на сплайсинг, кепиране и полиаденилиране (213). Промоторите и транскрипционните фактори за миРНК-ите не са добре познати, но тези които са проучени в повече детайли показват сходство със същите структури на протеин-кодиращите гени (212).

2.5 МиРНК биогенеза

2.5.1 Каноничен път на биогенеза

Това е основният път, по който се извършва зреенето на миРНК-ите. Изобразен е схематично на Фигура 1. Той се базира на процесинга на при-миРНК в пре-миРНК от микропроцесорен комплекс изграден от РНК-свързващия протеин DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) и рибонуклеаза III ензима Drosha (214). Всеки от двата компонента на комплекса има своя роля - DGCR8 разпознава N6-метиладенилираната GGAC последователност в при-миРНК, а Drosha разцепва при-миРНК в основата на stem-loop структурата (215, 216). Това води до наличие на два допълнителни нуклеотида в 3` края (216). Полученият прекурсор се експортира в цитоплазмата чрез ГТФ-зависим транспорт от експортин 5 и там протича втората стъпка от процесинга (212). С помощта на ендонуклеазата Dicer, асоциирана с РНК-свързващия протеин TRBP, регионът на бримката се разцепва и резултатът е зрял миРНК дуплекс с дължина около 22 нуклеотида (212).

Зрялата миРНК се инкорпорира в миРНК-индуциран инхибиращ комплекс (miRNA-induced silencing complex, miRISC), който се състои от водеща верига и протеин от семейството Argonaute (AGO) с представители 1-4 при хората (217). Обикновено след прикачването на зрелия миРНК дуплекс към miRISC едната от двете вериги деградира и напуска комплекса (212). Тя се означава като „съпътстваща“ верига (passenger strand) или верига със звездичка (star strand). Това може да се случи по два механизма – при наличие на комплементарност на дуплекса в централния регион passenger веригата се изрязва от AGO2 и се подлага на деградация от нуклеазния комплекс C3PO, а в случай на липса на комплементарност или невзаимодействие с AGO2, веригите се разделят пасивно и passenger веригата деградира (218-220).

В някои случаи и двете вериги от дуплекса остават в miRISC и продължават да функционират като зрели миРНКи. Тогава името на зрялата миРНК верига зависи от

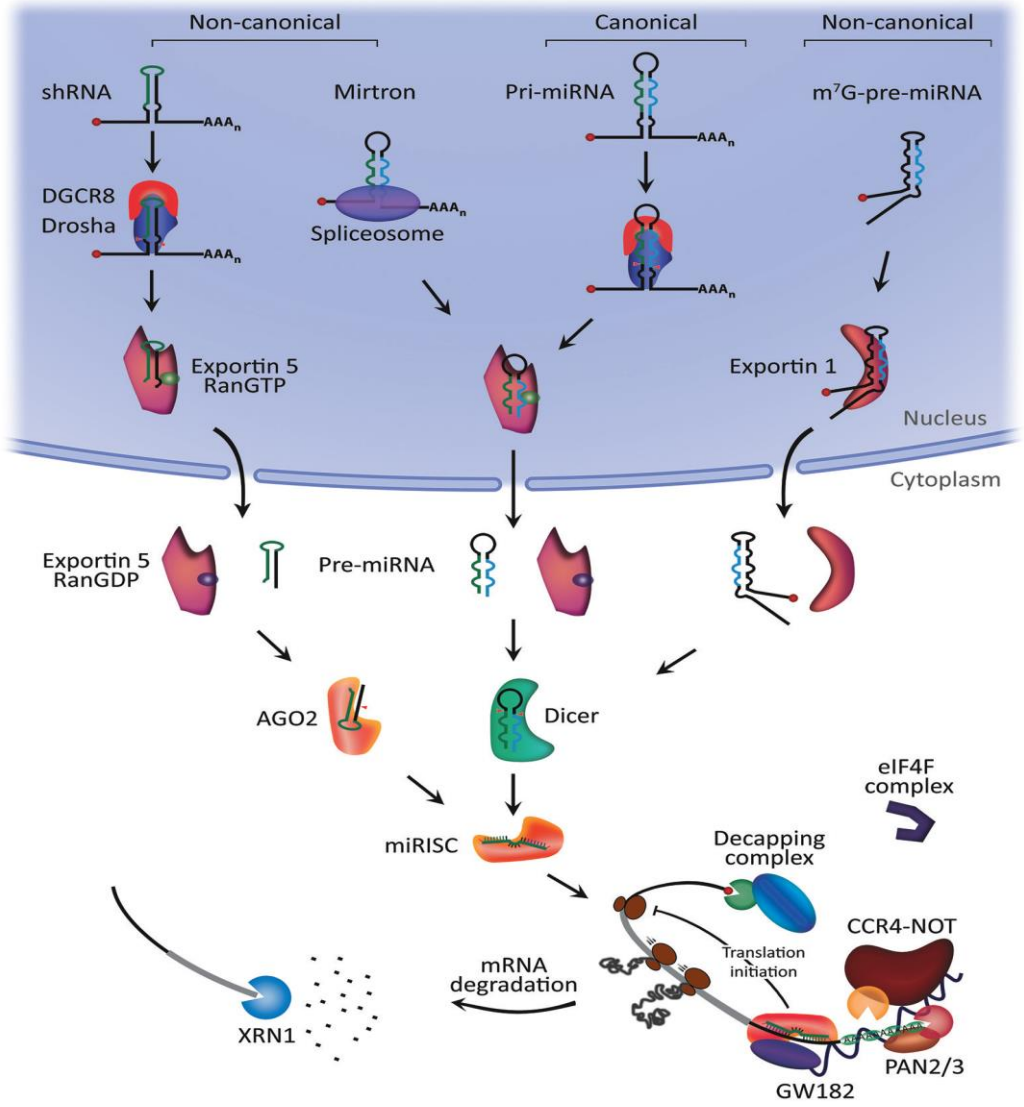
посоката, от която произлиза – 5p веригата произхожда от 5` края, а 3p – от 3` края (199). Тази номенклатура започва да се използва все повече практически, тъй като понякога двете вериги имат различна регулаторна функция в зависимост от типа на клетката и състоянието й (221).

2.5.2 Неканоничен път на биогенеза

Има няколко неканонични пътища на миРНК биогенеза, в които участват различна комбинация от протеини от каноничния път (199). Най-общо пътищата могат да бъдат разделени на две групи - Drosha/DGCR8-независими и Dicer-независими. В първата група влизат миртроните, които произхождат от интроните на иРНК, и 7-метилгуанозин кепираната пре-миРНК (199, 222, 223). Тези миРНК не са подложени на разцепване от Drosha, а директно се транспортират в цитоплазмата с помощта на експортин 1 и там продължава процесът на узряване (223). При Dicer-независимия път на биогенеза Drosha процесирането протича както при каноничния път, а процесът на матурация се извършва от AGO2 в цитоплазмата (224).

2.6 МиРНК-регулирано инхибиране на генната експресия

Своята функция в клетките миРНК-ите изпълняват чрез свързване на miRISC, носещ зрялата миРНК, с комплементарния участък от иРНК, наречен миРНК респонс елемент (miRNA response elements, MRE) (199). Нуклеотиди 2-7 от миРНК се нарича “seed” район и е отговорен за взаимодействието с иРНК (225, 226). В по-редки случаи е възможно разпознаването на таргетната иРНК да се осъществи от последователност в 3`-края или централно разположена (227). Начинът на инхибиране на експресията на гените зависи от степента на комплементарност между miRISC и MRE. В случай на пълна комплементарност се активира AGO2 ендонуклеазната активност и се разцепва таргетната иРНК (228). Това води до дестабилизиране на връзката между AGO2 и миРНК и впоследствие до деградация на последната (229). Когато такава комплементарност липсва, както е в повечето случаи при бозайниците, се формира miRISC инхибиращ комплекс. Той включва протеините от GW182 семейството, които привличат поли(A)-деаденилазните комплекси PAN2-PAN3 и CCR4-NOT, като този процес е последван от взаимодействие между миРНК и таргетната иРНК (230, 231). Това води до освобождаване на поли-А-опашката и в крайна сметка до деградация на таргетната иРНК (232, 233).



Фигура 1. МиРНК биогенеза и механизъм на действие (източник: doi: 10.3389/fendo.2018.00402)

2.7 Алтернативно повлияване на генната експресия от миРНК-и

Въпреки, че са известни със своето инхибиращо действие по отношение на транслацията, има данни, че миРНК могат и да я активират. Този процес включва AGO2 и FXR1 вместо GW182 (234). Няколко миРНК-и са регистрирани като активатори на транслацията при арест на клетъчния цикъл, но от друга страна инхибират транслацията при пролифериращи клетки (235). Това показва, че индуциращото действие на миРНКите по отношение на генната експресия се проявява при определени условия (236).

Съществуват данни за влияние на миРНКите и върху транскрипцията. MiRISC, локализиран в ядрото, може да повлиява нивото на транскрипция и пост

транскрипционните нива на иРНК (237, 238). Начинът, по който миРНК-ите оперират в ядрото не е напълно ясен. Възможно е ниско молекулните miRISC в ядрото да взаимодействат с иРНК и да индуцират нейната деградация (237, 239).

2.8 МиРНК циркулация

За разлика от клетъчната РНК, извънклетъчно циркулиращите миРНК се характеризират с изненадваща стабилност – устойчивост на деградация при тежки условия като множество цикли на замразяване и размразяване, стайна температура до четири дни, промени в pH (240, 241). Те са детектирани в серум/плазма, слюнка, перитонеална течност, урина, бронхиален лаваж и други телесни течности (192, 240-242). МиРНК-ите се транспортират по два начина – чрез микровезикули, екзозоми и апоптозни телца или чрез взаимодействие с протеини като AGO2, високо плътности липопротеини и нуклеофосмин (242-245). Все още не е ясно кой от двата начина на транспортиране в екстрацелуларното пространство е превалиращ (241, 242). Както везикулите, така и транспортните протеини осигуряват защита на миРНК-ите и повишават още повече тяхната стабилност в извънклетъчната среда (242).

Въпреки предположенията, че миРНК-ите в извънклетъчното пространство са продукти на различни клетъчни функции, все повече се потвърждава теорията, че тяхната секреция е добре регулиран процес (246). Има доказателства, че секрецията им е церамид-медиирана и достигайки до таргетните си клетки те повлияват растежните им функции (247). Например екзозомни миРНК-и, които регулират развитието на рак на гърдата, могат да бъдат регулирани от IL-4 и докозахексаенова киселина (71). Под въздействието на IL-4 макрофагите се активира екскрецията на екзозоми, носещи онкогенни миРНК-и, които стимулират инвазирането на рака на гърдата (248). От друга страна, DHA, която има антираково действие, може да потисне растежа на раковите клетки чрез индуциране на екскрецията на екзозоми, носещи миРНК-и, които инхибират неоангиогенезата (249).

МиРНК-ите могат да оперират и като междуклетъчни сигнални молекули. Пример може да се даде с екзозомно медиирания трансфер на miR-105 от клетки на рак на гърдата към ендотелни клетки, при които таргетираният адхезивен протеин zonula occludens 1 причинява нарушена бариерна функция на ендотела и последващо метастазиране (250).

Точният начин, по който екстрацелуларните миРНК-и навлизат в клетките не е напълно изяснен. Най-вероятно е предположението, че везикуларните миРНК-и използват фагоцитоза, ендоцитоза или сливане с клетъчната мембрана, а миРНК-ите, асоциирани с протеини, навлизат в клетките чрез специални рецептори (251).

2.9 МиРНК таргетна идентификация

От момента, в който е доказано, че миРНК-ите имат значение за регулацията на генната експресия, започват проучванията за търсене на конкретни таргетни гени за миРНК-и. Идентификацията на миРНК мишените е от изключително значение за науката и практиката. Познаването на точните таргети на миРНК-ите е ключ към разгадаване на тяхната биологична функция и следователно патогенетичните механизми на много заболявания. Освен това, определянето на миРНК мишени ще допринесе за разработване на нови диагностични методи и терапии (212). Съществуват три съвременни подхода в детектирането на миРНК таргети – биоинформационен, биохимичен и транскриптомен/протеомен анализ.

2.9.1 Таргетна идентификация, базирана на биоинформационни технологии

Това е сравнително нов подход, който взема предвид сложните предиктивни алгоритми и комплексното взаимодействие миРНК-таргет (252). Фактът, че миРНК-ите се свързват с таргетните си места според стандартните закони на комплементарност на базите, прави биоинформационния подход логичен и лесен за изпълнение метод за таргетното предиктиране. Таргетната идентификация е неефективна, ако е базирана само на комплементарност, поради много възможности за потенциални мишени и нисък процент на фалшиво позитивни резултати (212). За да бъдат намалени тези вероятности за грешки се използват допълнителни алгоритми и се взема предвид възможността за вариабилност на мястото на свързване на миРНК-таргет (252).

Съществуват много алгоритми за таргетна идентификация, които се различават основно по видовете, включени в тях, и използвания подход за създаването им. Съвременните алгоритми предоставят информация за миРНК експресия, секвенция, таргети и техните секвенции, нива на експресия в различни тъкани (253). Базите данни, които произхождат от тези алгоритми, дават възможност за точен анализ на експериментални данни (252). Сред най-използваните експериментално валидирани бази данни са TargetScan, DIANA-TarBase, PicTar и други.

2.9.2 Таргетна идентификация, базирана на биохимичен анализ

Няколко различни биохимично-базирани подхода се използват за детектиране на миРНК таргети. Първите опити за анализ са включвали имунопурификация на миРНК рибонуклеопротеинови комплекси, изолиране на иРНК и микроарей анализ на таргетните транскрипти (254). Впоследствие започва да се прилага имунопреципитация на RISC чрез използване на анти-Argonaute антитела и последващо детектиране на иРНК таргета чрез микроарей или секвениране от ново поколение (Next Generation Sequencing, NGS) профилиране (255-257). Друг подход е изолирането на специфични биотинилирани миРНК-и и последващо таргетно идентифициране, което е добър метод за детектиране на таргети на единични миРНК-и, но изисква предварителна подготовка на процеса на биотинилиране (236, 258).

Биохимичният таргетен анализ предоставя достоверна информация за таргетите на миРНК-ите и свързващите региони в иРНК, включително и тези, намиращи се в кодиращата последователност (252). Основен недостатък на биохимичния анализ е недостатъчното познаване на функционалната активност на свързващите последователности, което налага нуждата от провеждане на допълнителен транскриптомен анализ (259).

2.9.3 Таргетна идентификация, базирана на транскриптомен/протеомен анализ

Протеомният анализ, който количествено измерва ефекта на миРНК върху протеиновата продукция дава по-точна информация за таргета, но от техническа гледна точка е по-труден за изпъление (212). Знанията ни относно репресивното влияние на миРНК-ите върху нивото на таргетната иРНК дава възможност за прилагане на транскриптомен анализ (260). Съществуват няколко аналитични платформи за транскриптомен анализ, които най-общо се базират на микроарей технологията (261, 262).

2.10 Методи за миРНК експресионно профилиране

Методите за експресионно профилиране на миРНК-ите трябва да бъдат точни и финансово изгодни. Това начинание е свързано с известни трудности поради факта, че миРНК-ите са сравнително нова сфера на проучвания, което е предполага ненапълно изяснени аспекти от методологията на тестване (263). Експресионното профилиране на миРНК-и се прилага все по-широко във връзка с диагностични, прогностични и терапевтични аспекти на различни заболявания. Използват се различни методи – микроарей платформи, количествена

полимеразно верижна рекция в реално време (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR), секвениране, *in situ* хибридизация (264).

„Златен“ стандарт в количественото определяне на миРНК е количествената полимеразна верижна рекция с обратна транскрипция (RT-qPCR) (265). Основната PCR техника, която се използва е базиран на обратна транскрипция TaqMan® PCR тест (266). Процесът е двустъпален – на първия етап праймери се свързват към 3`-края на миРНК молекулите, за да се осъществи обратната транскрипция, а вторият етап включва PCR в реално време за количествено определяне на таргетните миРНК-и (267). Добра алтернатива на този метод е SYBR®-базираният RT-qPCR (266).

Хибридизационните методи и qRT-PCR имат висока чувствителност и са подходящи за проучване на малки групи миРНК-и (268). Хибридизационните методи включват основно флуоресцентната *in situ* хибридизация и хромогенна *in situ* хибридизация (CISH), които не изискват предварително протеазно третиране на тъканите за миРНК детекция (269)(270). Основно ограничение на тези методи е потенциалният риск от свързване на пробата с при- или пре-миРНК-ите (264). Детекцията чрез qRT-PCR изисква stem-loop обърнат праймер (reverse primer, RT primer), специфични праймери за идентификация на копи-ДНК (кДНК) и TaqMan проба (271).

Методите с най-висока производителност са микроарей платфомите и NGS. Микроарей платформите позволяват едновременен анализ на много миРНК-и на най-ниска цена спрямо всички останали методи за детекция (272). Недостатъците на този метод включват невъзможност за абсолютно точно количествено определяне и откриване на нови миРНК-и (272). Това ги прави най-полезни при определяне на нива на миРНКи в различни състояния (болни и контроли, болни в различен стадий и т.н.) (272). Технологията NGS позволява точно разграничаване на подобни миРНК-и, включително и изо-миРНК-и, както и детектиране на нови. За анализ на данните е необходим специален софтуер и обучени кадри (272).

2.11 Приложение на миРНКи

МиРНК-ите играят важна роля в основни физиологични процеси като растеж, диференциация, сигнална трансдукция, пролиферация, апоптоза (273, 274). Те упражняват контрол върху генната експресия и дисрегулацията на този процес води до патологични за

организма състояния. Използването на новите технологии за детектиране на миРНК-и предоставя възможност да се направи преход от лабораторaторните открития към клиничната практика. МиРНК-ите могат да бъдат от полза в различни направления.

2.11.1 Патогенетична основа на заболявания

Проучванията върху миРНК-и категорично доказват връзката между тези некодиращи молекули и различни заболявания при човека (275). Дисфункцията на миРНК-ите води до нарушаване на молекулни пътища в организма, които са в основата на развитието на патологични състояния. Това нагледно може да се спредстави чрез гените, сързани с канцерогенезата, които са сред основните таргети на миРНК-ите, макар и причината за това все още да не е известна (276, 277).

В изследването на механизмите на туморогенеза миРНК-ите се разделят в две категории: миРНК-и, които функционират като онкогени и такива, които чиято активност наподобява тумор-супресорни гени (278). Пример за онкогенна миРНК може да се даде с миР-21, която блокира апоптозата, а повишената й експресия е регистрирана при много от хематологичните злокачествени заболявания (хронична миелогенна левкемия, остра мегалобластна левкемия) и при солидни тумори (рак на панкреаса, на стомаха, на дебелото черво, глиобластом) (279, 280). При миР-155 също се наблюдава такова онкогенно дейстсвие – тя инхибира процеса на поправка на погрешно сдвоени бази при колоректален карцином (269). От друга страна миР-15 и миР-16 работят като тумор-супресори и потискат експресията на анти-апоптозния ген *bcl-2*, като така инициират клетъчна смърт (281). Сложните механизми, по които работят миРНК-ите се онагледяват още повече като се вземе предвид фактът, че една и съща миРНК може да функционира като онкоген в един тип клетки, а като тумор-супресор в друг. Например миР-222 е с понижена експресия в клетки от рак на черния дроб и таргетира *PTEN*, но с понижена експресия при еритробластна левремия, при която таргетира *c-KIT* онкогена (282).

МиРНК-ите имат основна роля и при други заболявания. Илюстративен пример може да бъде даден с различни нарушения на имунната система като автоимунни болести и хронични вирусни инфекции. Основният механизъм, по който се изменя имунният отговор е чрез влияние върху NF-kB (275). Най-добре характеризираните регулатори на нуклеарния рецептор са миРНК-155 и миР-146, като подобно повлияване е описано при редица заболявания – хроничен хепатит, множествена склероза, неалкохолен

стеатохепатит (283-285). Процесът се базира на повишена експресия на миР-146 поради активация от страна на NF-kB, а миР-146 от своя страна потиска експресията на *IRAK1* и *TRAF6*, които са активатори на NF-kB (286). Подобен е механизмът при повишената експресия на миР-155 от NF-kB, което води до инхибиране на *IKK-β* и *IKK-ε* и предотвратява постоянната активация на NF-kB (287).

2.11.2 Диагностични биомаркери

Най-търсеното приложение на миРНКите е да бъдат използвани като биомаркери за различни заболявания. Те биха могли да имат големи предимства пред използването на протеини като биомаркери, които се изследват със скъпи методи, с ниска специфичност и чувствителност. Сигнификантните протеини са малко и имат сложна структура (265). Освен това, стремежът към персонализиране на медицината изисква откриване на по-специфични молекули. Идеалният биомаркер трябва да бъде специфичен за болестта, да може да се детектира в ранен стадий, да бъде лесно достъпен (неинвазивен или полуинвазивен) и да бъде свързан с познат механизъм на патогенеза (288). И най-важното условие – да успее да бъде внедрен в клиничната практика (289). МиРНК-ите са лесно достъпни, тъканно-специфични и се детектират с доказани методи. Те се явяват идеален кандидат-биомаркер, особено след доказването на тяхната стабилност в плазма и обработени тъкани (264).

Най-голям брой проучвания по отношение на перспективите за използването на миРНКи като биомаркери се правят в сферата на малигнените заболявания. При рака на яйчника има убедителни данни за повишена експресия на миР-30c и понижена на миР-342-3p, миР-181a и миР-450b в кръв от пациенти (290). Тези изменения не се откриват при други типове рак и не се повлияват от химиотерапията и възпалителни процеси (290). Развитието на рак на шийката на матката също показва асоциация с променената миРНК експресия. В кръв на пациентки с тази диагноза са детектирани редица миРНКи с повишена експресия - миР-20a, миР-21, миР-203, миР-205, миР-485-5, сред тях и такива, които са тъканно специфични - миР-7, миР-10a, миР-135b and миР-149 (291). Циркулиращата миР-21 е предложена като биомаркер при В-клетъчен лимфом, а миР-143 - при рак на простата (292, 293). Освен като маркер за диагностицика, миРНКите могат да бъдат от полза и като маркер за развитие на резистентност към химиотерапия (294). Като такива са предложени

миР-375, миР-34а и миР-664, чиято промяна в експресията води до промяна в чувствителността към терапия (295-297).

МиРНКите са предложени като кандидат-биомаркери и в сферата на неврологията. В случаи на болест на Паркинсон това са свръхекспресираните миР-103а, миР-30b- и- миР-29а, на глиобластом – свръхекспресираните миР-21, миР-221, миР-222, миР-335 и недостатъчно експресираните миР-124, миР-137, миР-218, миР-451, а при болест на Алцхаймер – свръхекспресираните миР-9, миР-34а, миР-125b, миР-146а, миР-155 (265).

Интересна възможност за приложение на миРНКите е в сферата на спешната кардиология, където те биха могли да бъдат бърз и точен маркер за остър коронарен синдром. Тази идея произча от основният недостатък на тропонините – увеличаването им при други кардиологични и извън кардиологични патологични състояния. Различните проучвания в областта показват едно и също отклонение – повишена експресия на миР-1, миР-133а, миР-208а/b и миР-499 при миокарден инфаркт (298-300).

2.11.3 Прогностични биомаркери

Стадирането на заболяванията е от изключително важно значение за провеждане на ефективна терапия, за превенция на усложения и за определяне на прогноза. Откриването на достатъчно специфичен прогностичен и стадиращ биомаркер би улеснило работата на лекарите и от друга страна би дало по-точна информация на болните във връзка със състоянието им. МиРНК-ите представляват добър кандидат-биомаркер за прогнозирането на тежестта на различни патологични състояния.

Добра информативна стойност показват анализите при пациенти с остеосарком. При тях е детектирано значимо понижена експресия на миР-223 както в серум, така и в ракова тъкан (301). МиРНК-223 функционира като тумор-супресор, инхибирайки прогресията и пролиферацията на остеосаркомните клетки (302). Експресията на тази миРНК се понижава с напредването на раковия стадий и с развитието на далечни метастази (301). Това превръща миР-223 в надежден и ефективен прогностичен биомаркер за остеосарком. Експресионният анализ на 26 миРНКи в тъкан от сквамозноклетъчен орофарингеален карцином показва статистически значими разлики между нискорискови и високорискови пациенти (303). Изследването има допълнителна прогностична стойност чрез разкриване на предиктивен маркер за HPV-позитивен карцином (303). Проучвания са правени върху

следоперативната преживяемост при пациенти с рак на белия дроб с кандидат-биомаркер let-7, както и върху прогресията на хронична лимфоцитна левкемия с възможни кандидат-биомаркер миР-15а и миР-16-1 (304, 305).

2.11.4 Терапевтично приложение

Способността на миРНК-ите да таргетират различни иРНК-и, които се променят в условията на заболяване, ги превръща в нови кандидати за терапевтично повлияване (като миРНК мимики) или като таргети на лекарства (като анти-миРНК) (306). Първоначалните опити за такъв вид лечение са включвали вирус-носител, който системно или локално да пренесе молекулите до прицелната тъкан (306). Този начин така и не достига до клинична реализация поради редица причини – лесна деградация в кръвта, невъзможност за достига до желаната дестинация при системно приложение и трудности при практическото локално приложение (307). Към момента основният фокус на проучванията в областта е насочен към осигуряване на миРНК стабилност и оптимален подход при приложение с минимален риск за нежелани реакции.

Както се спомена по-горе, две са основните стратегии за използването на миРНК-и в терапията на заболявания – блокиране на експресията на миРНК-и, асоциирани с патогенезата на дадено заболяване и медикаментозна промяна на процесите на транскрипция и процесинг на миРНК, което да доведе до промяна в експресията им (308). Към момента има няколко потенциални миРНК-базирани терапии, които са в етап на клинични проучвания (309). Първото лекарство, намиращо се във фаза II на клинично изпитване е миравирсен, което представлява LNA (locked nucleic acid)-модифициран олигонуклеотид, инхибиращ миР-122 (264, 309). Тази миРНК, която е специфична за черния дроб и съставлява 70% от всички миРНК-и там, е с доказана роля при развитие на хепатит С вирус (ХСВ) инфекция (264). Лечението на шимпанзета с хронична ХСВ инфекция с миравирсен показва добро потискане на вируса с минимални странични реакции (264). Фаза I на клинични проучвания показва безопастност при употребата при хора, което прави възможно навлизането във фаза II (264).

3. МиРНК – приложения в сферата на ендометриозата

В ерата на модерните технологии и новите научни открития, ендометриозата е заболяване, за което научаваме все повече, но въпреки това остава неразбрано. Причината се корени главно в липсата на достатъчно знания относно молекулярните механизми, които водят до

развитието й. Липсата на тази информация е причина за трудностите в откриването на достатъчно точен и надежден метод за диагностика без да се налага лапароскопия. Това от своя страна води до отлагане времето за диагностициране, закъсняло лечение и задълбочаване на заболяването. Друг проблем, който предизвиква недостатъчното познание от страна на молекулните механизми на ендометриозата, е невъзможността за използване на патогенетична терапия, която да постигне пълно излекуване.

Както вече беше споменато, дерегулацията на миРНК-и води до патологични състояния в организма. МиРНК-ите регулират молекулярни пътища, за които се смята, че са ключови за ендометриозата – възпаление, апоптоза, ангиогенеза, тъканен интегритет и други (310). Освен това, една миРНК може да таргетира множество иРНК-и и по този начин да контролира различни аспекти на болестния процес (191). Всичко това, в допълнение с факта, че дерегулирани миРНК-и са детектирани при много заболявания, включително и гинекологични, дава основание да се предположи, че тези малки молекули може да са в основата на разгадаването на загадката ендометриоза.

През последните години се работи изключително интензивно по възможността миРНК-ите да донесат информация относно патогенезата на ендометриозата и с това да допринесат за оптимална диагностика, проследяване и лечение. Някои от детектираните миРНК-и са асоциирани с молекулните пътища на болестта, докато други имат неизяснена функция, но са белег за наличието на ендометриоза (311). Търсените разлики в миРНК експресионния профил между здрави пациентки и такива с ендометриоза са детектирани както в кръв, така и в тъкан. Поради тази причина тук те ще бъдат разгледани поотделно.

3.1 Експресионно профилиране миРНКи в тъканни проби

В зависимост от тъканите, които подлежат на сравнение, се различават няколко подхода при тъканното миРНК профилиране. Част от проучванията сравняват ектопичен и еутопичен ендометриум от една и съща пациентка, други правят сравнение между ендометриозна тъкан от болни пациентки с ендометрална тъкан от здрави контроли (311). Съществуват единични изследвания, използващи различни сравнения в зависимост от целта на анализа – те тестват тъкан от ендометриум на болни и здрави жени в определен момент от месечния цикъл (312).

Най-често използваните методи за миРНК профилиране са тези с най-добра производителност – миРНК микроарей и NGS платформи. Резултатите от тези експерименти се подлагат на анализ, като кандидат молекулите биват подбирани на база разликата в експресията над/под определен праг (311). Повечето платформи считат разлика под/над 2 пъти за статистически значима, тък тато дори малка разлика в нивото на миРНК експресия може да доведе до промяна на нормалното физиологично състояние (311).

Проучванията в областта на миРНК експресионното прифилиране при пациентки с ендометриоза са много. Трудно е да бъдат отсяти конкретни реултати поради големия брой миРНК-и, различните технически платформи, които се използват и най-вече малкият брой случаи, които са част от отделните научни разработки. Заради това, мета анализът е подходящ начин за справяне със споменатите негативи и обединяване на резултатите от многобройните изследвания (313). През 2015 година е публикуван мета анализ, обединяващ 12 публикации, изпълняващи допустимите критерии за миРНК експресионно профилиране в тъканни проби при пациентки с ендометриоза (313). Открити са 134 миРНК-и с променена експресия, като 28 от тях са детектирани в повече от две проучвания (313). По отношение на промяната в експресията четири от тях са регистрирани винаги с повишена експресия, девет – с понижена експресия, а 15 – с вариращa такава в различните публикации (313).

Редица други публикации също доказват разлики в миРНК експресионния профил в тъканни проби – докладвани са различни на брой миРНК-и с намалена или повишена експресия при сравнение между ендометриозна и здрава тъкан (314-316). Анализът на миРНК таргети и техните функции в организма показват различни молекулни пътища, които са нарушени при развитието на ендометриозата. Такава информация е от изключително значение за обогатяване на представите ни за етиопатогенетичните нарушения, които индуцират патологичното състояние и последващите възможности за диагностика и терапия.

Внимателното анализиране на резултатите от многобройните изследвания показва определени миРНК-и, които са докладвани със сходни промени в експресията в различни публикации. Най-често идентифицираните миРНК-и с постоянна експресионна промяна са семейство миР-200 (311). Неговите представители миР-200a, миР-200b, миР-200c, миР-141

и миР-429 са регистрирани със статистически значима понижена експресия при всички проучвания, в които са включени, макар и някои да са споменати в единични публикации (313). Семейството миР-200 е основен регулатор на ЕМП, който е процес с ключова роля в развитието на ендометриоза (317). Освен това, семейството е с водеща роля за метастазирането на рака на яйчника, което допълнително засилва влиянието му върху равитието на ендометриозните лезии (318). Един от представителите на семейството миР-200b е детектиран с понижена експресия и в други видове рак – на бял дроб, простата и други (319, 320).

Освен миР-200 фамилията, други миРНК-и също се споменават по-често от други в публикации относно експресионен анализ на тъканни проби. В Таблица 4 са изброени част от миРНК-ите, които са докладвани в повече от три проучвания с еднаква промяна в експресията, включена е и информация за основния биологичния процес, с който се асоциират (321).

Таблица 4. МиРНК-и с променена експресия между засегната и здрава тъкан

МиРНК	Промяна в експресията	Биологична функция
miR-196b	Понижена	Клетъчна пролиферация, стимулиране на апоптозата
miR-202	Повижена	Клетъчна пролиферация и инвазия
miR-145	Повишена	Антиапоптозно действие
miR-183	Понижена	Клетъчен растеж и диференциация
miR-34c	Понижена	Тумор-супресорно действие
miR-100	Повишена	Миграция на гладкомускулните клетки в кръвоносните съдове
miR-375	Повишена	Регулация на клетъчния цикъл

Големият брой анализи показва редица миРНК-и с променена експресия между ендометриозна и здрава тъкан. Последващи по-задълбочени проучвания засягат въпроса за конкретното влияние на тези миРНК-и върху патологичния процес. Различават се два вида миРНКи – първите са „иницииращи“ (drivers) миРНК-и, които контролират базисни пътища в патофизиологичния модел на ендометриозата, а вторите са „съпътстващи“ (passengers) миРНК-и, чиято експресия се променя при прогресиране на болестта (322). На този етап това разделение е условно поради различията в отделните миРНК анализи.

Очевидна е нуждата от стандартизация на дизайна на проучванията за по-бърз прогрес относно ролята на миРНК-ите в произхода на ендометриозата (322).

Тъканната хетерогеност е най-голямото предизвикателство пред проучванията върху миРНК експресионното профилиране (321). По време на оперативната интервенция се взима тъканна биосия, която след това се подлага на съответния анализ. Проблемът е, че биосичният материал съдържа клетки от обграждащите тъкани (яйчник, перитонеиум и други), а стромалните и епителните ендометриални клетки са в различни пропорции (321). Това може до доведе до замъгляване на резултатите, очаквани от анализът на ектопиченн/еутопичен ендометриум. Дизайнът на експериментите следва да премине към използване на отделни клетъчни популации, но на този етап това все още е трудно изпълнимо в стандартната лабораторна практика.

3.2 Експресионно профилиране на циркулиращи миРНКи

Циркулиращи миРНК-и се откриват в повечето телесни течности, най-вече в кръвта (192, 242). Особеностите на транспорта им, описан в раздел II, част 2.8, предполагат стабилността им в циркулацията. Предполага се, че тези миРНК повлияват ендометриозните лезии чрез осъществяване на комуникация между еутопичния и ектопичния ендометриум, какъвто механизъм е описан при рака (323). По този начин е възможно ендометриозните лезии да променят експресията на гени в маточната лигавица под влияние на циркулиращите миРНК-и (311, 324).

За откриването на миРНК-ите, имащи отношение към ендометриозата, се налага обзор на литературните данни по въпроса. Тук възниква проблемът, касаещ резултатите от различните проучвания. Научните групи използват различен подход при изследването на миРНК в циркулацията – различнен материал, методи, хетерогенна група пациентки и контроли, различни стадии на болестта, на месечни цикъл, изключване не определени коморбидности и други. Не бива да се подценява и фактът, че използваният праг, над/под който се определя статистическа значимост също може да варира. Всичко това налага внимателно разглеждане на публикуваните резултати за по-качествено разбиране на условията, при които са получени, ползите от тях и възможните ограничения.

Познат е фактът, че миРНК-ите са атрактивни кандидат биомаркери поради стабилността им в телесните течности, сравнително простото им устройство, липсата на пост

транслационни модификации и тъканната им специфичност (192). Последното определя, че тяхната дисрегулация, детектирана в периферна кръв, би насочило към конкретна тъканна патология (325). Това ги превръща в добри какндидати за диагностична и прогностична цел за много заболявания, включително и ендометриоза.

Една от миРНК-ите, предложена като биомаркер за ендометриоза, е миР-20а, която е детектирана с намалена експресия в няколко проучвания (326, 327). Регистрираната експресионна дисрегулация води до повишена концентрация на таргетните TGF-β и IL-8 (328). Тяхната функция включва възпалителна реакция и тъканна поправка, което обяснява развитието на ендометриозните лезии (328). В допълнение трябва да се спомене, че миР-20а е докладвана с повишена експресия в случаи на ендометриоми в напреднал стадий и има значение за неоваскуларизацията (329). Също така тази миРНК не е специфична на ендометриозата, тъй като е регистрирана и при някои видове рак (328).

МиР-199 има специфичност и сензитивност над 75% за ендометриоза (330). Понижената й експресия се асоциира с клетъчна инвазия поради стимулиране експресията на IKK/NF-κB Nf-κB и IL-8 (331). За съжаление, добрите резултати, които показват тези изследвания, не са напълно категорични, тъй като в литературата се споменава случаи на повишена експресия на миР-199 при жени с ендометриоза (330).

Докладваните до момента циркулиращи миРНК-и с разлика в експресията между пациентки с ендометриоза и здрави контроли са много. В Таблица 5 са представени някои от тези миРНК-и с информация за биологичния процес, в който вземат участие (311).

Циркулиращите миРНК-и са сред най-обещаващите кандидат биомаркери, които имат потенциал да помогнат в диагностицирането и стадирането на ендометриозата. За да се достигне по-бързо до този етап, е необходимо допълнително проучване и стандартизиране на методите за миРНК профилиране (191). Както е видно от описаното по-горе, към момента има сериозна разлика в методологията на изследванията в тази сфера. Това налага нуждата от добре контролирани проучвания върху голям брой пациенти в различни популация, надежни методи за детекция на миРНК-и, определяне на тяхната експресия и анализ на техните таргети за разбиране на връзката между миРНК-ите и болестта. Валидирането на нов биомаркер изисква той да бъде повече или също толкова информативен, колкото най-ефективния метод към момента (332).

Таблица 5. Циркулиращи миРНКи с промяна в експресията между пациентки с ендометриоза и здрави контроли

МиРНК	Телесна течност	Биологична функция
Семейство let-7	Серум	Клетъчна миграция, пролиферация и инвазия
миР-9	Серум	Ангиогенеза
миР-125b	Серум	Клетъчна пролиферация, ниво на CA125
миР-143	Серум	Клетъчна инвазия и миграция
миР-145	Серум и плазма	Клетъчна пролиферация и инвазия
миР-200a	Плазма	ЕМТ
миР-451	Серум и перитонеална течност	Клетъчна пролиферация

3.3 Органичения в приложението на миРНКи

Най-съществено органичение за получаване на надеждни резултати от различните анализи и за успеха в клиничното внедряване на миРНК-и е липсата на възпроизводимост на данните. Причините за това се коренят в хетерогенността на изследванията – разнообразието от използвани методи, разлики в клиничното описание на случаите и подбора на контролите, вариабилният дизайн на проучванията. Правилното определяне на миРНК експресията в която и да е тъкан изисква надеждно дефиниране на позитивните и негативните резултати, внимателно проследяване на целия процес на миРНК изолиране и обработка, за да се минимизират възможностите за отклонения, оптимизация на експерименталния процес и обработката на данните (333).

Клиничното приложение на миРНК-ите изисква свеждане до минимум на възможността за фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати, което изисква висока степен на чувствителност и специфичност (265). Част от детектираните миРНК-и имат ниска диагностична специфичност, защото показват различна експресия при отделните проучвания, откриват се при повече от една патология и имат малка експресионна разлика между случаи и контроли. Избягването на този проблем налага анализ на по-големи кохорти с ясно дефинирани клинични критерии и стандартизация на използваните методи.

Едно изследване при плъхове от 2017 година повдига друг възможен проблем в използването на миРНК-и в клиничната практика (334). Възможно е да съществува

разлика в концентрацията на миРНК-и в артериална и венозна кръв, като миРНК профилът в артериална кръв да корелира по-добре с този в тъкани (334). Данните при хора показват сходен резултат, макар да са нужни допълнителни анализи за доказването на такъв феномен (335).

3.4 Перспективи пред приложението на миРНКи

МиРНК-ите са сравнително ново откритие в науката, а тяхното експресионно профилиране е още по-ново предизвикателство за учените. Въпреки малкото изминало време от идеята за използването им в клиничната практира, са открити огромен брой миРНК-и, а за много от тях са дефинирани таргетите и са определени процесите, в които вземат участие. Тъканната специфичност предполага тяхното участие в много различни патологии при човека. Това активно търсене от много научни групи създава предпоставка за очакван значим успех в тяхното интегриране в клиничната практика с цел диагностика, прогнозиране и лечение на заболявания.

Откритието, че миРНК-ите могат да бъдат детектирани не само в тъканите, но и в телесните течности още повече увеличава техния потенциал за клинично приложение. Екстрацелуларните миРНКи изпълняват изискуемите критерии за биомаркери – те са стабилни, специфични, могат да бъдат детектирани неинвазивно (311). МиРНК-ите предоставят възможност за навременно откриване на болестта, което предполага ограничения на последиците от нея чрез ранно начало на терапия. Едно от потенциалните приложения на миРНК-ите е в сферата на персонализираната медицина. Детекцията на индивидуални нива на експресия може да спомогне за индивидуален подход по отношение на лечението и така да се постигнат по-трайни резултати (311). Освен това, те биха могли да се използват и като маркер за ефективност на приложена терапия. Това вече е демонстрирано в животински модели при лечение със симвастатин (336).

Ендометриозта е хронично заболяване с неизяснена патогенеза, липса на диагностичен биомаркер и ултимативно лечение. Сложността на тази болест предполага търсене на нови начини за справяне с нея. МиРНКите имат потенциал за запълнят празнините в знанията за това заболяване, а с настоящата научна разработка се надявам да допринеса за този процес.

III. 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 експресионнионното 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.

IV. 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 1.4);
- ✓ 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 6. 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-ите 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 РНК-и 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 ($1,6x10^8$ 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.

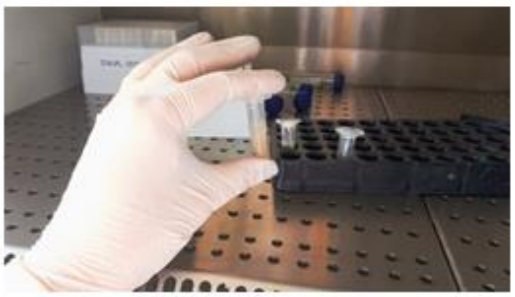
2.1.2 Техника на изолиране на ДНК

- 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 2. 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

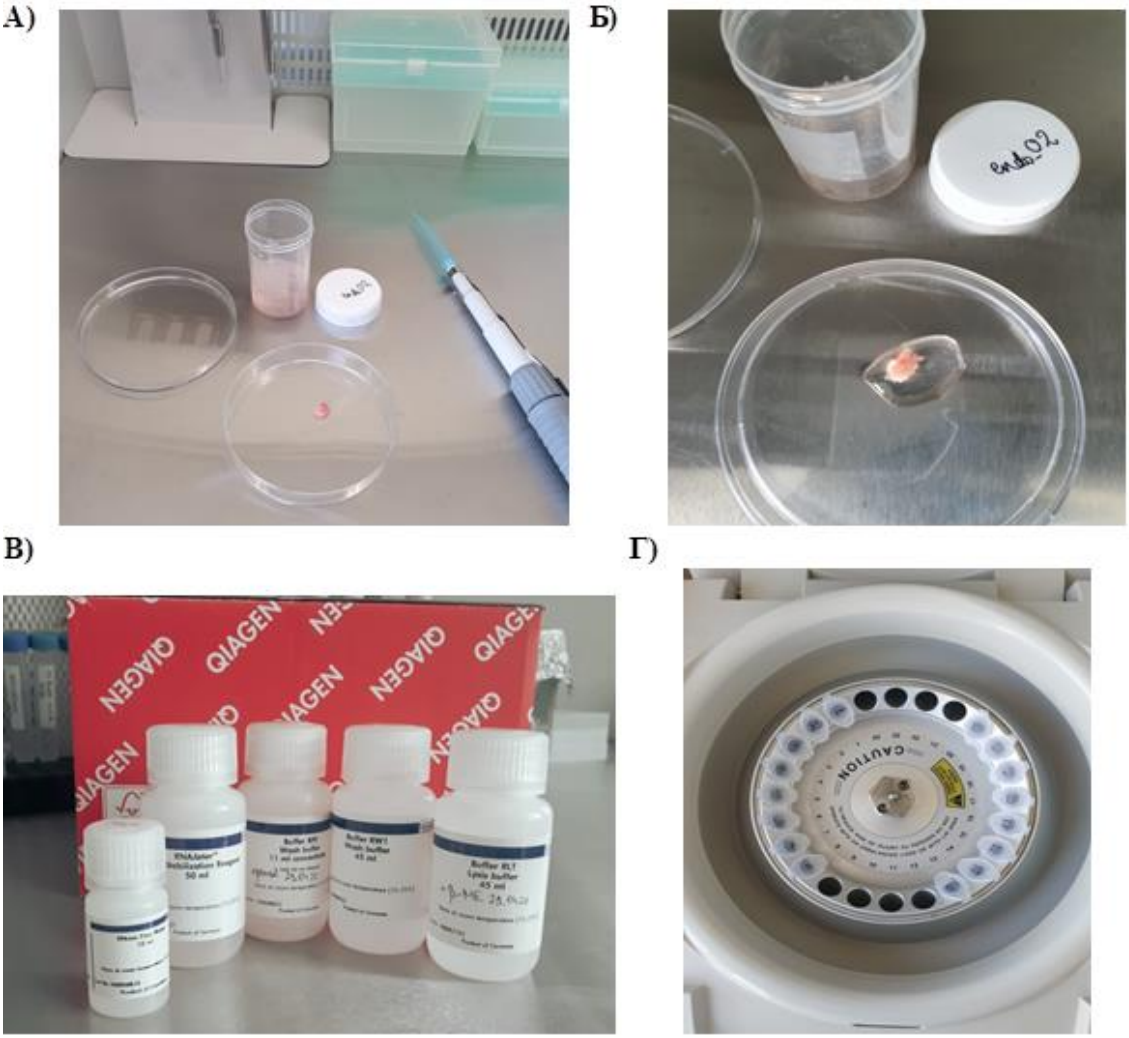
От събраните тъканни проби от 15-те пациенти в ранен стадий на ендометриоза, 15-те пациенти в късен стадий и от 15-те контроли се изолира РНК чрез кит на Qiagen® miRNeasy MiniKit. Според инструкциите на производителя от всяка тъканна проба се отдели количество от 30 мг за екстракция на РНК.

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.



Фигура 3. 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 -80^{o}C. 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

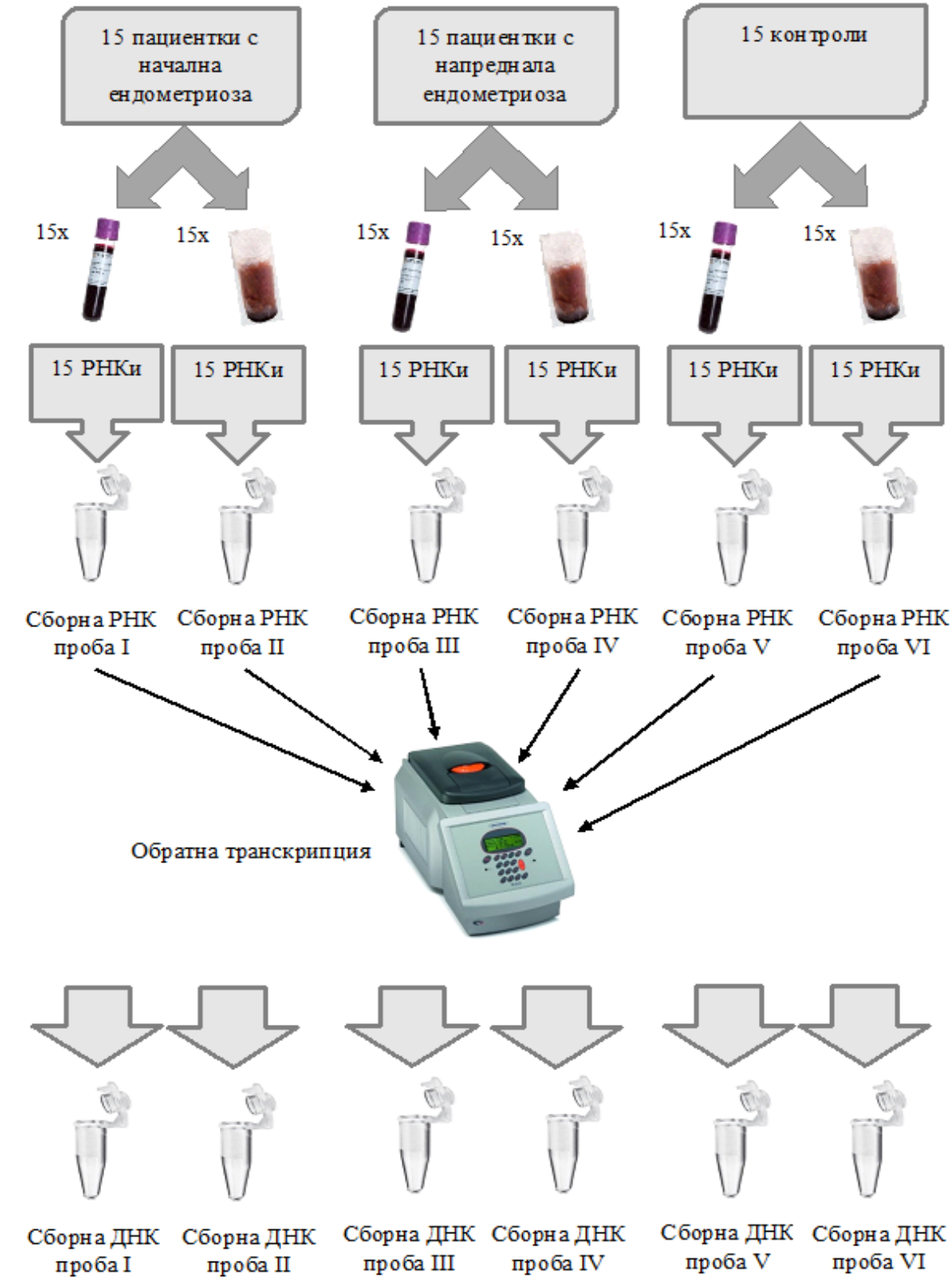
Получените ДНК-проби, изолирани от кръв са кодирани, описани и съхранени на -20^{o}C. Качеството и количеството на ДНК са записвани в електронно досие на пациента. Всички данни са въведени в разработена налична база данни на пациентите и контролите.

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 4. 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 РНК-и в кДНК. Освен това, той потиска преобразуването на дългите РНКи, в резултат, на което фоновите сигнали, дължащи се потенциално на тях, се минимизират. Зрелите миРНК-и 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 миРНК-ите, 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.

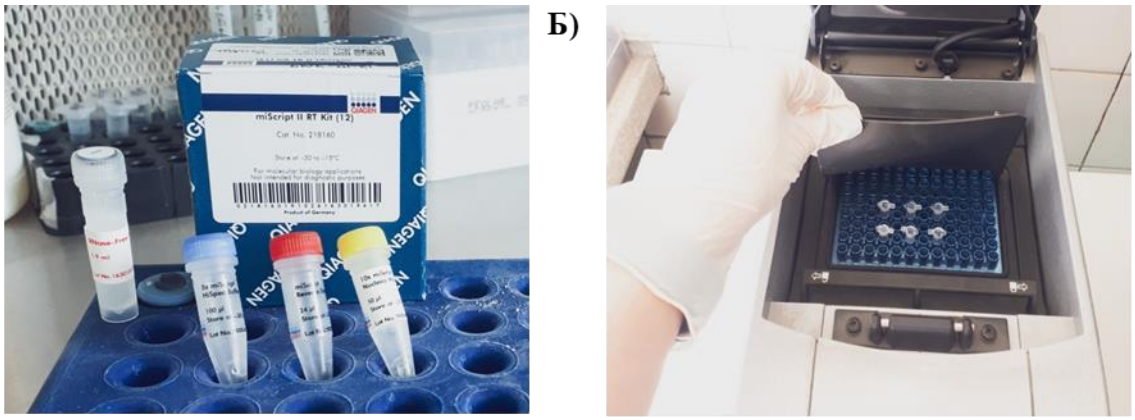
Процес на превръщане на РНК в кДНК:

- 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 5. 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 миРНК-и. 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 РНК-и – 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:

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

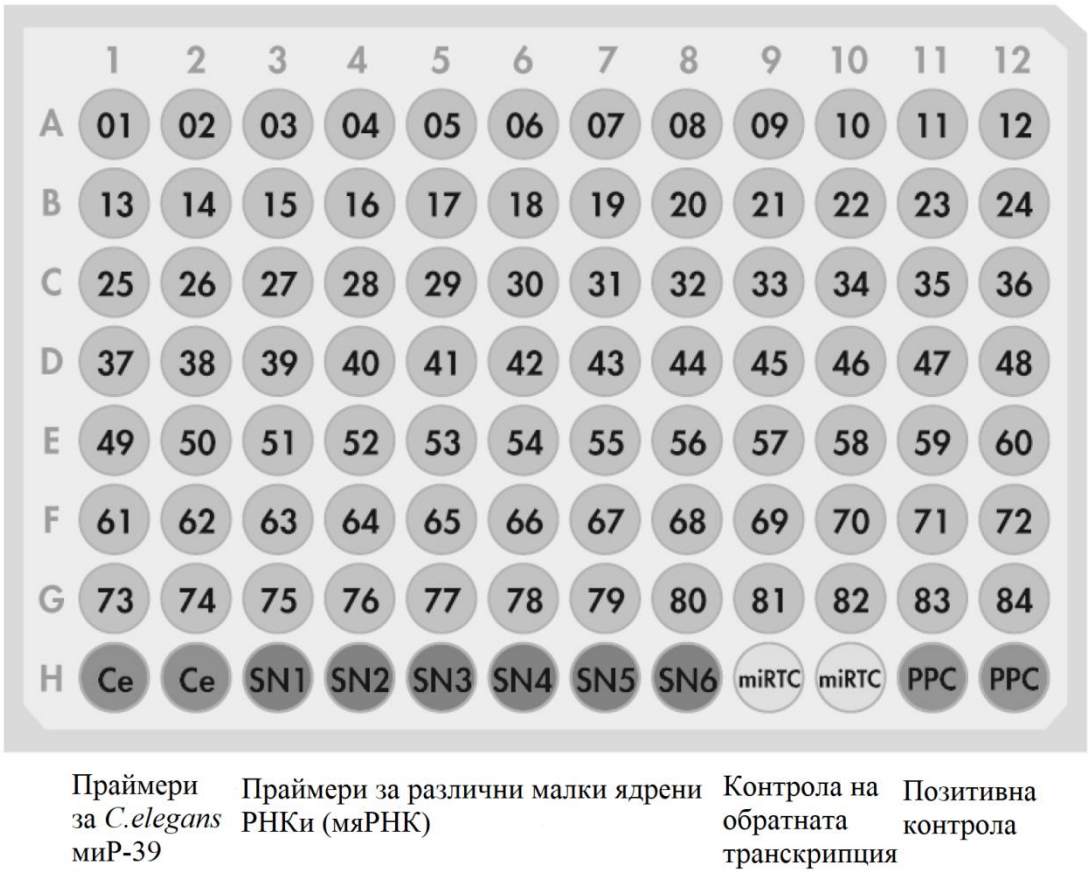
$_{\Delta\Delta}$Ct за всяка миРНК от двете miScript miRNA PCR плаки е изчислена според формулата:

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

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 (миРНК-и), което би затруднило изследването на голям брой миРНК-и. 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 миРНК-и.

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 миРНК-и (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 6. Дизайн на 96-ямковата плаката за експресионен анализ

2.7.1 Техника за количествено определяне на експресионните нива на миРНК-и в плазма от RT-PCR върху миРНК чипове

За експресионния анализ на миРНК-и 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 миРНК-и (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 7. 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 8. 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 миРНК-и от тъкан с RT-PCR върху миРНК чипове

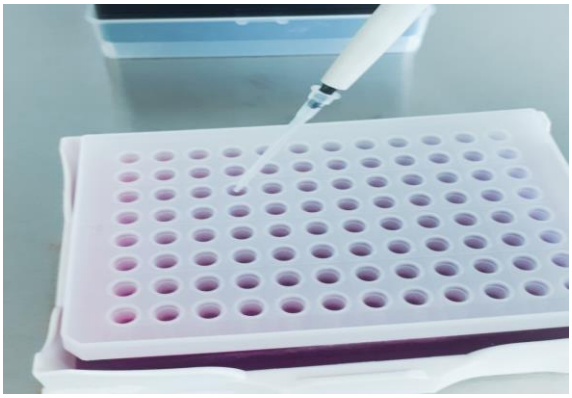
За експресионния анализ на миРНКи беше използван 96-ямков Human miFinder miRNA PCR Array (Qiagen®). Той включва панел от миРНКи, подбрани въз основа на резултатите, публикувани в рецензирани списания, които показват корелация между серумните им нива на експресия и широк панел от заболявания.

- 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).

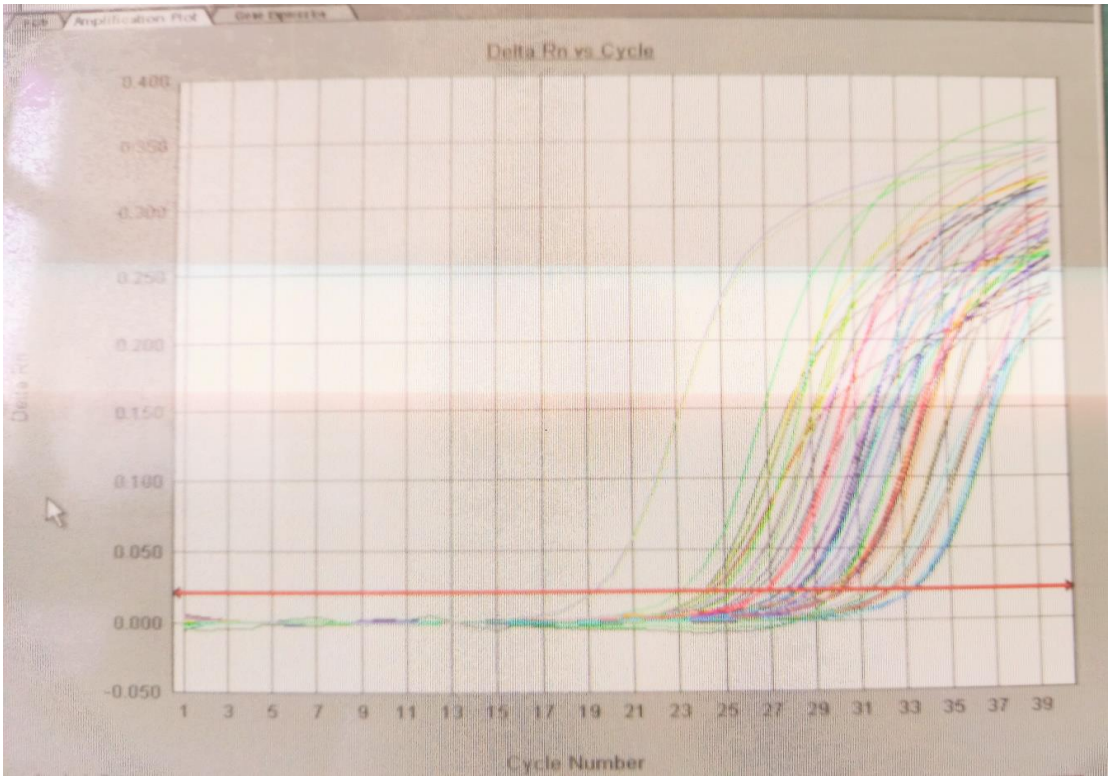
А)



Б)



В)



Фигура 7. 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 2.9.1.

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

V. 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 години, 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.

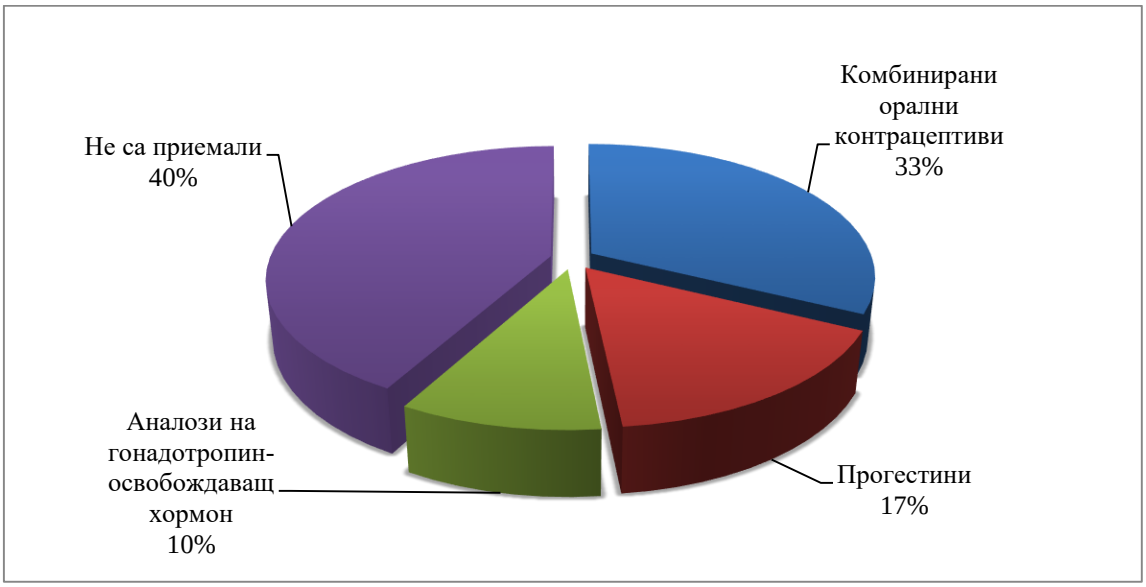
Мнозинството от участничките съобщават, че месечният им цикъл е редовен. Броят менструации за последната година при всички е 12 и при всички такава е настъпила в последните три месеца. В групата на ранната ендометриоза при една пациентка е докладвано закъснение в рамките на 3-7 дни, а в групата на късната 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 9. 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-a (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 8. 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 10. 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**	**-**

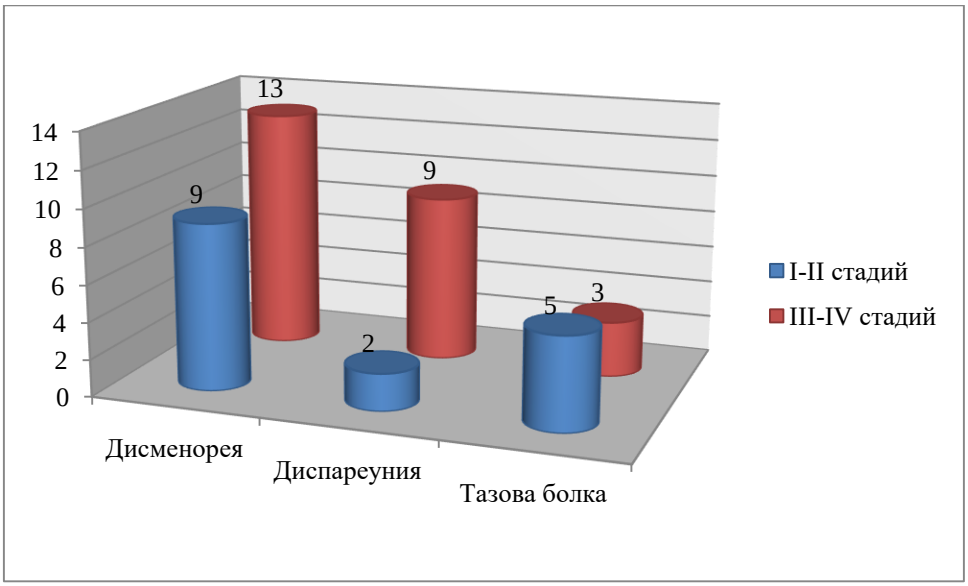
1.3 Болка

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 9. 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

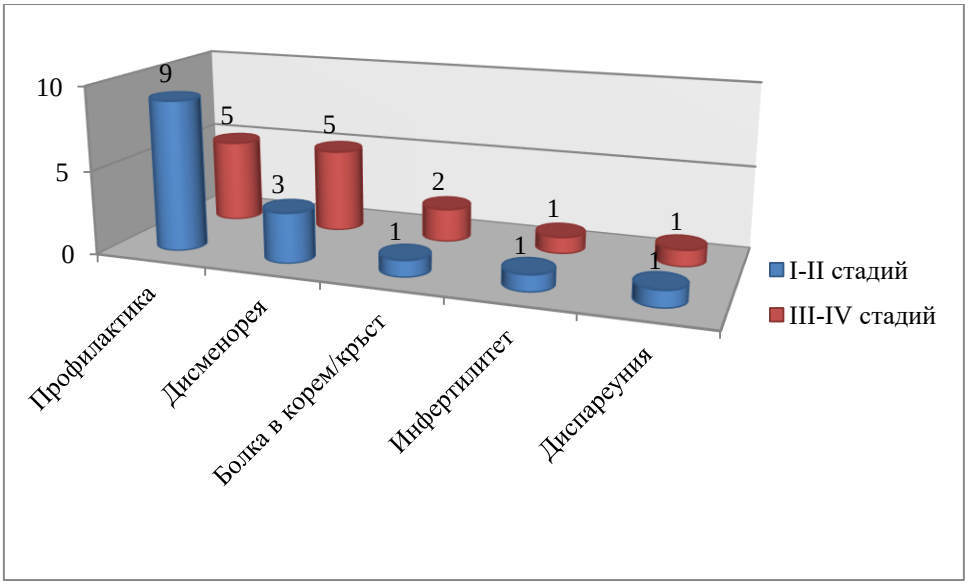
за чувство на недоизпразване на пикочния мехур, трудности при отделяне на урина и чести уроинфекции.

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.

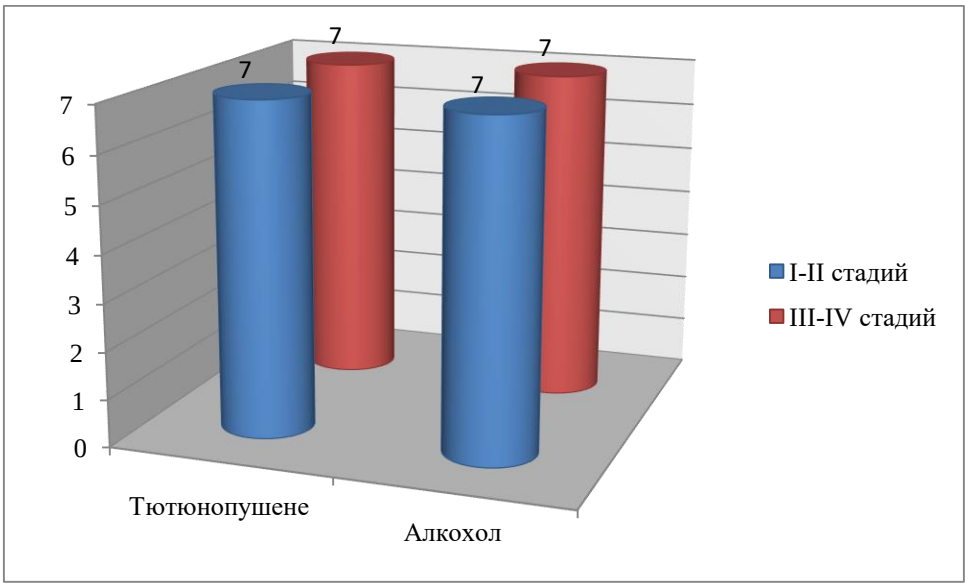
За период по-дълъг от три месеца 17% (n=5) от пациентките са приемали комбинирани орални контрацептиви, 7% (n=2) - гозерелин и единични случаи - антипсихотично средство, аналгетик, L-тироксин или хепарин с ниско молекулно тегло.



Фигура 10. 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 11. 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 11. 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 12. 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 миРНК-и 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 миРНК-и 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 13. 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 на всички 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 14. 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

	III-IV стадий	**Контролна група**	промяна в експресията
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	561.1852708	2.48084798	**226.20**
hsa-miR-17-5p			
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 на всички 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 15. 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-и. 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 16. 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 три 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 17. 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 18. 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, покриващи 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).

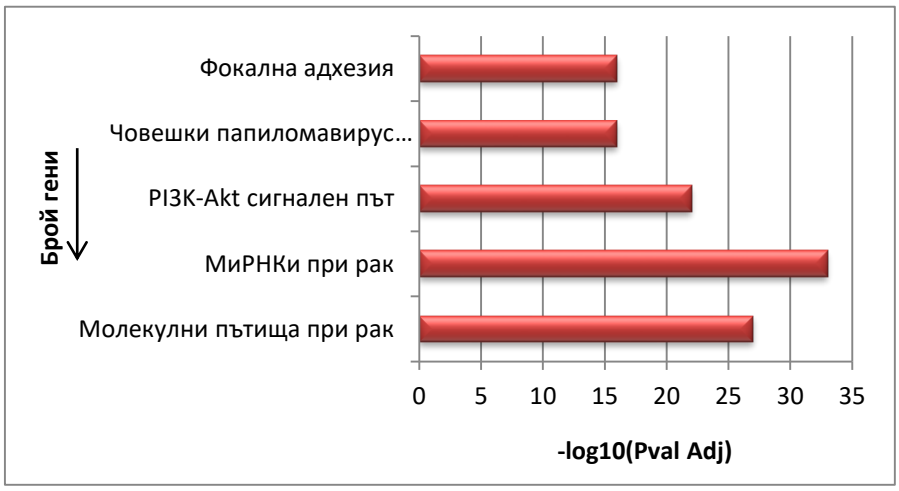
Таблица 19. Най-значими GO биологични пътища, в които участват миР-200c, миР-196b, миР-21 и миР-7f

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

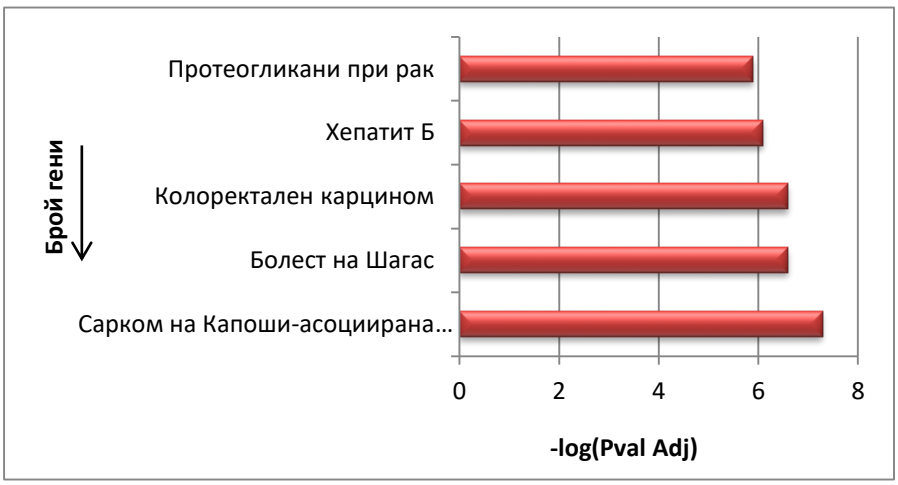
Регулация на транскрипцията	GO:0006357	19	1.155e+01	1.328e-12
Позитивна регулация на генната експресия	GO:0010628	14	1.931e+01	6.278e-12
	hsa-miR-196b-5p			
Регулация на транскрипцията, dna-templated	GO:0006355	8	2.906e+01	5.083e-08
Регулация на транскрипцията	GO:0006357	8	2.632e+01	5.551e-08
Негативна 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	GO:0000715	3	4.427e+02	3.154e-06

ДНК 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

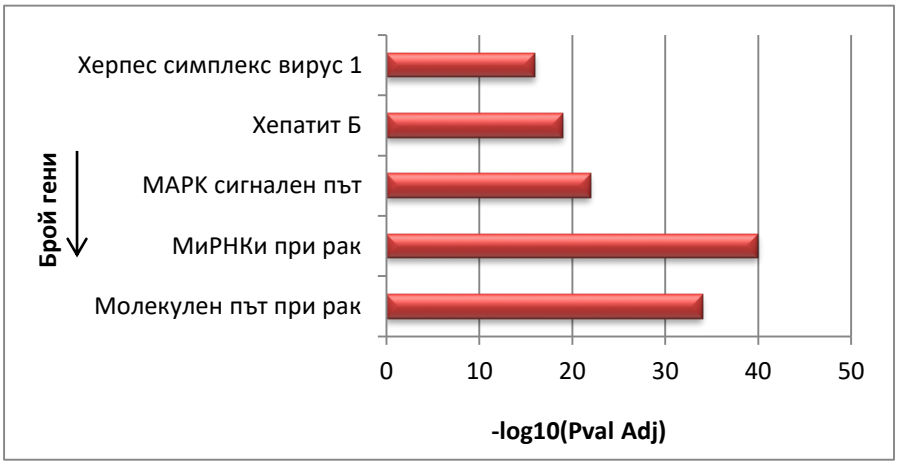
Най-значимите KEGG пътища на всяка от четирите миРНК-и поотделно са показани на Фигури 12-15.



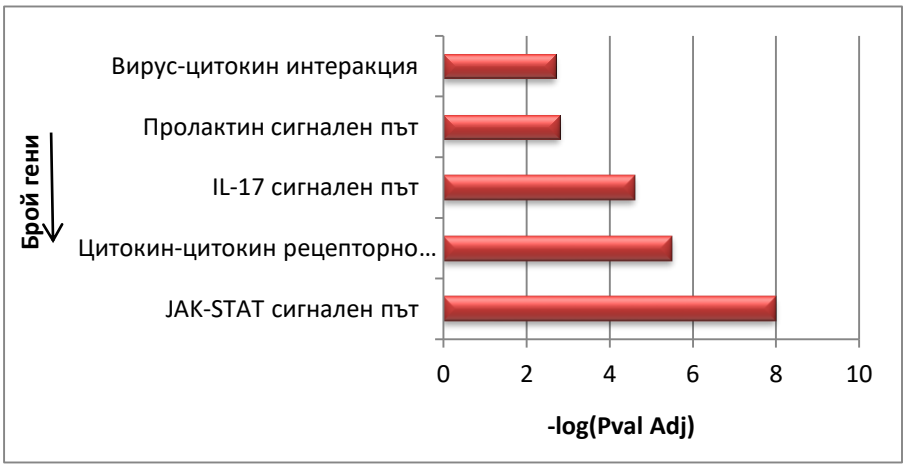
Фигура 12. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-200c



Фигура 13. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-196b



Фигура 14. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-21



Фигура 15. Най-значими KEGG пътища, в които участва миР-7f

VI. 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% са засегнати 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 7-11 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.

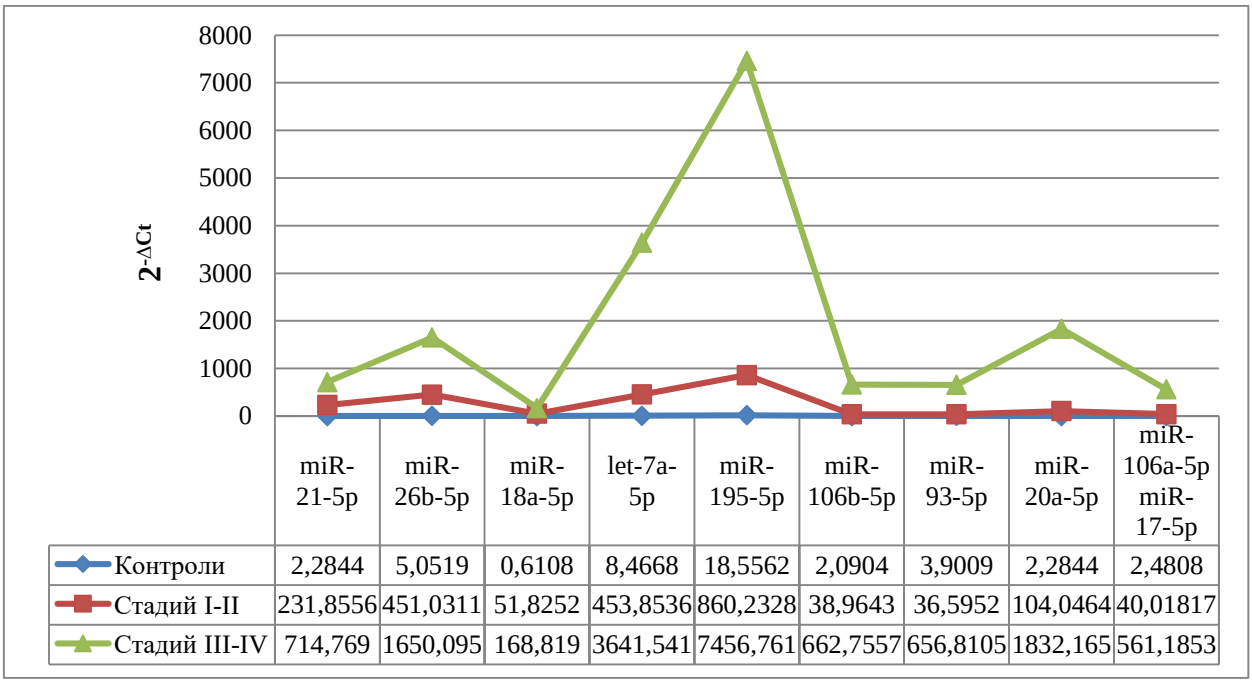
2. Обсъждане на резултатите от експресионния анализ на миРНК-и в кръвна плазма

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 миРНК-и 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 миРНК-ите 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.



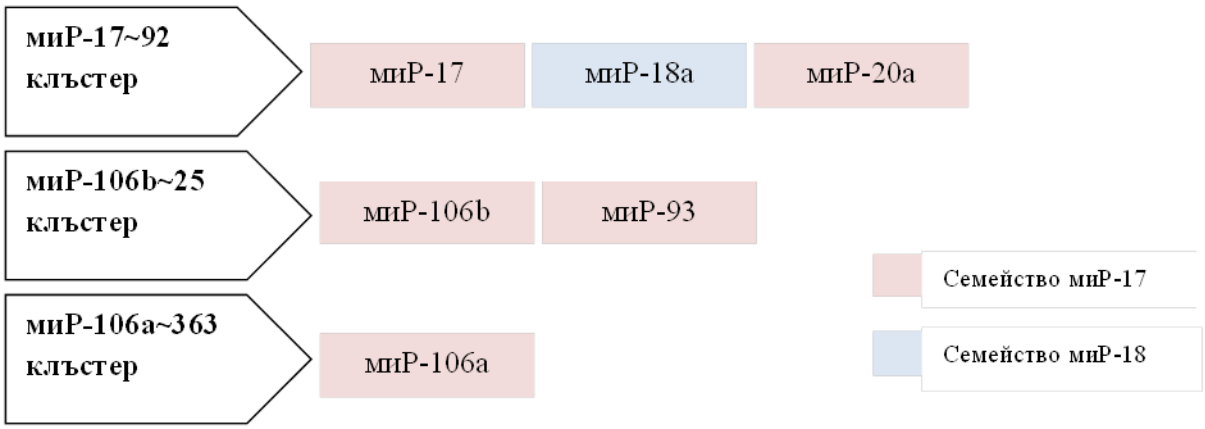
	miR-21-5p	miR-26b-5p	miR-18a-5p	let-7a-5p	miR-195-5p	miR-106b-5p	miR-93-5p	miR-20a-5p	miR-106a-5p miR-17-5p
Контроли	2,2844	5,0519	0,6108	8,4668	18,5562	2,0904	3,9009	2,2844	2,4808
Стадий I-II	231,8556	451,0311	51,8252	453,8536	860,2328	38,9643	36,5952	104,0464	40,01817
Стадий III-IV	714,769	1650,095	168,819	3641,541	7456,761	662,7557	656,8105	1832,165	561,1853

Фигура 16. Разликите в експресията на миРНКите с потенциал за неинвазивен биомаркер за ендометриоза между контроли, пациенти в стадий I-II и стадий III-IV

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.

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 17. 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-20a, миР-93, миР-17 и миР-106a 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 1.5.2) 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 миРНК-и, 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 асоциирането ѝ 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 ѝ 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 ѝ 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 ѝ 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-195-5р, миР-26b-5р, миР-106b-5р и миР-21-5р.

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 2.2). 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 й 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 й 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 1.5).

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-196b-5p е най-значимо дерегулираната при сравнение между ранен стадий на ендометриоза и контроли, между късен стадий на ендометриоза и контроли, както и между двата стадия. МиР-200c-3p е детектирана със значимо намаляване на експресията в ранния и късния стадий на болестта спрямо контроли, 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 миРНК-и 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 3.1). 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

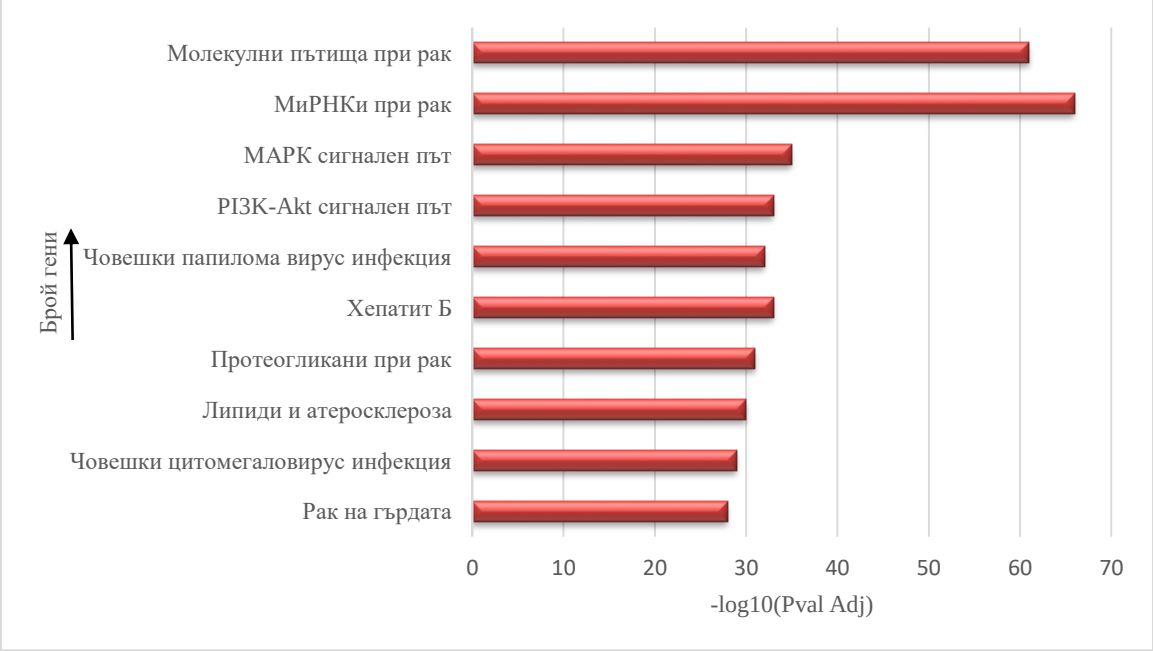
способна да стимулира апоптозата (407). Следователно, пониженатa експресия на миР-21 води до активиране на *FasL* и потискане на апоптозната функция, което от своя страна дава възможност за развитие на ендометриозните лезии. Такъв процес е логичен и от гледна точка на получените резултати, според които 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 взаиодействието 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). Пониженатa 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. Пониженатa 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 ЕМП, 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 18. 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 финитe 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.

VII. 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 миР-106a 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.

VIII. 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 миР106a 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.

IX. Приложения

Приложение 1. Адаптиран клиничен въпросник за пациентките, участници в проучването

1. На колко години бяхте, когато настъпи първата ви менструация? .....
2. Имала ли сте менструация през последните 3 месеца? .....
3. Ако отговорът на горния въпрос е **НЕ**, каква е причината?

□ Прием на хормонален препарат □ Не съм сигурна

□ Бременност/кърмене □ Друго - .....

4. Приблизително колко пъти сте имали менструация през последната една година?

.....

5. Кога беше последната Ви менструация?

□ в последните 0-3 месеца □ в последните 3-6 месеца

□ в последните 7-12 месеца □ преди повече от 12 месеца

6. Ако сте имали менструация през последната година:
   - Спонтанна или хормон-индуцирана беше? .....
   - Редовна ли беше менструацията?

□ изключително редовна □ с отклонение от 3-7 дни

□ с отклонение от 8-20 дни □ с отклонение от 21 и повече дни

   - Колко дни средно продължава? .....

7. Избройте всички хормонални препарати, които сте използвали, независимо по каква причина (акне, нередовна менструация, контрацепция, инфертилитет и др.) и посочете причината: .....

.....

.....

   - Колко време сте ги приемала? .....

8. Използвала ли сте някога вътрематочна спирала и за какъв период от време?

.....

9. Била ли сте бременна някога? .....
10. Ако отговорът е **ДА**, как стана забременяването?

□ Спонтанно □ Чрез стимулирана овулация

□ Вътрематочна инсеминация □ Ин витро/ICSI фертилизация

11. Ако отговорът е **ДА**, как завърши бременността?

□ Раждане на здраво(и) дете(деца) □ Мъртво раждане

□ Спонтанен аборт □ Аборт по желание

□ Извънматочна бременност □ Моларна бременност

□ В момента съм бременна

12. Опитвали ли сте да забременеете за повече от 6 месеца без резултат? .....
13. Ако отговорът е **ДА**, търсили ли сте медицинска помощ, за да откриете причината?

.....

14. Ако отговорът е **ДА**, установи ли се причина и каква е тя? .....

.....

15. Предприемали ли сте някакъв вид лечение на инфертилитета и какво? .....

.....

16. Имате ли болка по време на менструация? .....
17. На каква възраст започна болезнената менструация?.....
18. Приемате ли медикаменти за справяне с болката? Какви? .....

.....

19. През последната една година случвало ли се е менструалната болка да е толкова силна, че да повлияе качеството Ви на живот? Колко често се случва? .....

.....

20. Случвало ли се е да изпитвате болка по време на полов акт или в последващите 24 часа? .....
21. Ако се е случвало през последната една година, колко често сте имали болка?

□ Винаги/почти винаги □ Повече от половината случаи

□ В половината от случаите □ В по-малко от половината случаи

22. Изпитвали ли сте болка ниско в таза, която да не е причинена от менструация, полов акт, операция, бременност, раждане, спортна/битова травма, реакция към храни, чревен вирус? .....
23. Ако отговорът е **ДА**, колко често се случва да изпитвате подобна болка? .....

.....

24. Ако отговорът е **ДА**, приемали ли сте медикаменти за справяне с тази болка и какви?.....
25. Ако отговорът е **ДА**, поставяна ли Ви е диагноза във връзка с тази болка? Каква?

.....

26. Някога била ли сте диагностицирана със злокачествено заболяване? .....
27. Ако отговорът е **ДА**, с какво и кога е поставена диагнозата? .....

.....

28. Имате ли някакъв вид вродена аномалия/структурен дефект на матка/тръби/яйчници/шийка/влагалище? Ако отговорът е **ДА**, какъв е той? ....
29. Оперирана ли сте била някога? Ако отговорът е **ДА**, каква беше причината? .....

.....

30. Случвало ли ви се в последната една година някое от следните:

□ Ректално кървене □ Свиване в областта на червата

□ Кръв в изпражненията □ Слуз в изпражненията

□ Ходене по голяма нужда по-малко от 3 пъти седмично

□ Ходене по голяма нужда повече от 3 пъти на ден

□ Спешна нужда от ходене по голяма нужда

□ Чувство на недоизпразване на дебелото черво

31. Случвало ли ви се в последната една година някое от следните:

□ Изпускане на урина при кихане, кашляне, смях □ Кръв в урината

□ Трудности при изпускането на урина □ Чести уринарни инфекции

□ Чувство на недоизразване на пикочния мехур

32. Поставяна ли Ви е диагноза ендометриоза? .....
33. Как е поставена диагнозата?

□ лапароскопия/отворена операция □ ултразвук/ЯМР

□ симптоматично □ друго - .....

34. Ако сте претърпели операция по повод на ендометриоза, излекувана ли беше тя?

.....

35. Кои симптоми Ви накараха да потърсите лекар преди да Ви е поставена диагнозата? .....

.....

36. На колко години бяхте, когато Ви поставиха диагноза ендометриоза? .....

37. Правили ли са Ви операция с цел търсене на ендометриоза без да намерят такава?

.....

38. Има ли Ваша роднина от женски пол, която да е имала ендометриоза или хронична тазова болка?

□ Майка □ Баба по майчина линия □ Леля по майчина линия

□ Сестра □ Баба по бащина линия □ Леля по бащина линия

□ Братовчедка по майчина линия □ Братовчедка по бащина линия

39. Приемали ли сте някакви лекарства за период по-дълъг от 3 месеца? Какви?

.....

.....

40. Кога сте родена? ...../...../.....

41. Пушете ли? .....

42. Консумирате ли алкохол? Какво е средното количество, което пиете седмично?

.....

Благодаря Ви за отделеното време!

Приложение 2. Информация за пациента и информирано съгласие

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ДНК и миРНК АНАЛИЗ

ПРОЕКТ НА ТЕМА:

Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез миРНК експресионно профилиране.

Аз, долуподписаната_____

ЕГН:_____

Съм съгласен/а да участвам в скрининг за дерегулация в експресията на миРНКи в ендометриозни лезии с прогностично значение и в кръв - с потенциал за неинвазивни диагностични маркери.

Целите на изследването са: 1) да се създаде биобанка от проби на пациенти в ендометриоза в различен стадий и 2) да се изследва екпресионния профил на миРНК в ендометриозни лезии за търсена на биомаркери с прогностично значение и в кръвни проби за търсене на биомаркери с диагностично значение, което в бъдеще би могло да доведе до намаляване на необходимостта от инвазивна (ендоскопска) диагостика на заболяването. Резултатите от изследването имат значение за подобряване на общественото здраве.

Изследването, за което е необходима дарената проба, е по проект на тема: "Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза и чрез миРНК експресионно профилиране" с ръководител гл.ас. д-р Рада Станева - Цветкова, дб към Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет - София. Установяването на миРНК-експресионния профил (миРНК са част от системата, която регулира процесите в клетката) на ендометриозни лезии в различен стадий ще позволи в бъдеще да се дефинират по-точни, чуствителни и специфични биомаркери, които да имат прогностично значение по отношение на биологичното поведение на заболяването. Установяването на миРНК-експресионния профил в кръв на пациенти с ендометриоза в различен стадий ще подпомогне в бъдеще да се разработи диагностичен тест за ендометриоза, който да намали необходимостта от ендоскопско изследване за поставяне на диагнозата. Допълнително могат да се открият маркери подходящи за стадиране на болестта.

Ще Ви бъдем благодарни ако се съгласите да помогнете за провеждането на това изследване. Участието се изразява в даване на проба от ендометриозна лезия, кръвна проба и попълване на клиничен въпросник.

Вашето име и лични данни ще се запазят в тайна и ще бъдат достъпни само на лекаря, който е взел пробата Ви. Веднага след като дадете кръвна проба, епруветките с кръв и данните за вас ще бъдат означени с цифров код, така че няма да съдържат Вашето име, инициали, или други данни, по които можете да бъдете идентифициран. Вашата биологична проба ще се използва за изолиране на ДНК и миРНК (генетичен материал). Резултатите от това изследване няма да Ви бъдат предоставени и ще бъдат използвани само за научни цели.

Моят подпис долу означава, че съм съгласен да дам тъканна и кръвна проба за изолиране на ДНК (ДезоксирибоНуклеинова Киселина), която съдържа наследствена информация и миРНКи (микроРибоНуклеинови Киселини), чиято експресия ще бъде изследвана.

Поставеният от мен подпис по-долу потвърждава моето доброволно участие в това изследване, но по никакъв начин не освобождава персонала, извършващ изследването от тяхната професионална и етична отговорност спрямо мен.

Моят подпис долу означава, че съм съгласна неизползваното количество ДНК/миРНК, тъкан да бъде съхранявано и използвано за качествен контрол.

Моят подпис долу означава, че съм съгласна взетата от мен проба и резултатите от този и други анализи да бъдат използвани за научни разработки и публикувани в научни списания, при условие че данните са анонимни и защитени

Разбирам, че няма да получа информация за моите резултати от това изследване, които ще бъдат използвани само за научна цел. Взимането на тъканна проба от ендометриозните лезии ще се извърши според стандартите за добра медицинска практика и като част от стандартните диагностични процедури свързани с ендометриозата. Взимането на кръвна проба в най-лошия случай може да причини малко неудобство в мястото на вземане.

Разбирам, че при провеждане на изследването само информацията, записана на втората страница на тази бланка, ще бъде известна на изследователите в лабораторията на Катедрата по медицинска генетика, МУ-София. Тази информация няма да включва моето име, фамилия и други данни за моята самоличност. Пълната информация ще бъде известна само на координатора на проекта. Към информацията, изпратена до лабораториите ще бъдат включени само цифровия код и отговорите на клиничния въпросник.

Участието в този проект е напълно доброволно. Вие можете да се откажете по всяко време, като това няма да има негативни последствия върху Вас. Ако искате да получите по-подробна писмена информация за проекта, да дискутирате някои въпроси, или ако имате оплаквания от начина, по който са се отнесли с Вас в хода на участието Ви в проекта можете да пишете на следния адрес:

Медицински университет София, Медицински факултет, Катедра по Медицинска генетика, ул. "Здраве "2, „Майчин дом ", ет.6, п.к. 1431

или да се свържете с д-р Виктория Спасова на e-mail адрес: vic.spasova@gmail.com или на телефон 02/917 27 35.

Документът, който подписвам ще бъде пазен на сигурно място от лекаря, който организира събирането на пробите.

Подпис на пациента: .....

Обясних същността на изследването на гореподписаната. Отговорих на всичките му въпроси.

Име на лекаря:_____
подпис:_____
дата: _____

Цифров код на донора (вписан в приложената бланка и върху епруветката с кръвна проба, които ще бъдат изпратени в лабораторията за анализ)

.....

Дата: .....

Име и подпис на лекаря, взел пробата: .....

.....

Адрес на лабораторията, ангажирана с анализа на взетата проба:

Катедра по медицинска генетика, Медицински факултет, Медицински университет София, България, гр. София, ул. «Здраве», 2, 02-9520357

Цифров код на донора, записан на епруветката с кръвната проба:

.....

Забележки:

.....

Приложение 3. Етична оценка от КЕНИМУС

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ **РЕКТОРАТ**

1431 София, бул. Акад. Ив Евст. Гешов 15, тел. 952 3791, 9152 129, факс: 953 28 16

№ 4934 Дата 14.12.2018г.

ДО
ПРОФ. ВАЛЕНТИНА ПЕТКОВА, ДФН
ПРЕДСЕДАТЕЛ
СЪВЕТ ПО МЕДИЦИНСКА НАУКА

КОПИЕ ДО:
ГЛ. АС. Д-Р РАДА ГЕОРГИЕВА СТАНЕВА ЦВЕТКОВА, ДБ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕН КОМПЛЕКС
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Относно: Научно изследване с пореден **№ 69** на обсъждане в КЕНИМУС, по преписка вх. № ВК-1547/21.11.2018 г., регистриран в СМН по конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения-2018" с **вх. № 4731/03.07.2018 г.**

УВАЖАЕМА ПРОФ. ПЕТКОВА,

На основание Карта за етична експертна оценка на научни разработки и проекти предвиждащи научни изследвания с участието на хора и Карта за етична експертна оценка на научни разработки и проекти предвиждащи научни генетични изследвания, мотивирано становище и доклад на член на КЕНИМУС и след проведена дискусия, с решение взето с Протокол № 24/07.12.2018 г., комисията счита, че **научните изследвания** на тема "*Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез миРНК експресионно профилиране*", с водещ изследовател гл. ас. д-р Рада Георгиева Станева Цветкова, дб с база за изпълнение на проекта Медицински факултет, Медико-биологичен комплекс, Катедра по медицинска генетика, ***отговарят на етичните изисквания в националното и международното законодателство за провеждане на научни изследвания и одобрява провеждането на планираната изследователска дейност.***

ПРЕДСЕДАТЕЛ НА КЕНИМУС:
ПРОФ. Д-Р САШКА ПОПОВА, ДМ

РЕКТОР:
ПРОФ. Д-Р ВИКТОР ЗЛАТКОВ, ДМ

Изготвил:
Натали Димитрова
Секретар на КЕНИМУС

Приложение 4. Списък на миРНК-ите, включени в Human Serum & Plasma miRNA PCR Array

Позиция в плаката	МиРНК праймер
A01	hsa-let-7a-5p
A02	hsa-miR-1-3p
A03	hsa-miR-100-5p
A04	hsa-miR-106b-5p
A05	hsa-miR-10b-5p
A06	hsa-miR-122-5p
A07	hsa-miR-124-3p
A08	hsa-miR-125b-5p
A09	hsa-miR-126-3p
A10	hsa-miR-133a-3p
A11	hsa-miR-133b
A12	hsa-miR-134-5p
B01	hsa-miR-141-3p
B02	hsa-miR-143-3p
B03	hsa-miR-146a-5p
B04	hsa-miR-150-5p
B05	hsa-miR-155-5p
B06	hsa-miR-106a-5p hsa-miR-17-5p
B07	hsa-miR-17-3p
B08	hsa-miR-18a-5p
B09	hsa-miR-192-5p
B10	hsa-miR-195-5p
B11	hsa-miR-196a-5p
B12	hsa-miR-19a-3p
C01	hsa-miR-19b-3p
C02	hsa-miR-200a-3p
C03	hsa-miR-200b-3p
C04	hsa-miR-200c-3p
C05	hsa-miR-203a-3p
C06	hsa-miR-205-5p
C07	hsa-miR-208a-3p
C08	hsa-miR-20a-5p
C09	hsa-miR-21-5p
C10	hsa-miR-210-3p
C11	hsa-miR-214-3p
C12	hsa-miR-215-5p
D01	hsa-miR-221-3p
D02	hsa-miR-222-3p
D03	hsa-miR-223-3p
D04	hsa-miR-224-5p
D05	hsa-miR-23a-3p

D06	hsa-miR-25-3p
D07	hsa-miR-27a-3p
D08	hsa-miR-296-5p
D09	hsa-miR-29a-3p
D10	hsa-miR-30d-5p
D11	hsa-miR-34a-5p
D12	hsa-miR-375
E01	hsa-miR-423-5p
E02	hsa-miR-499a-5p
E03	hsa-miR-574-3p
E04	hsa-miR-885-5p
E05	hsa-miR-9-5p
E06	hsa-miR-92a-3p
E07	hsa-miR-93-5p
E08	hsa-let-7c-5p
E09	hsa-miR-107
E10	hsa-miR-10a-5p
E11	hsa-miR-128-3p
E12	hsa-miR-130b-3p
F01	hsa-miR-145-5p
F02	hsa-miR-148a-3p
F03	hsa-miR-15a-5p
F04	hsa-miR-184
F05	hsa-miR-193a-5p
F06	hsa-miR-204-5p
F07	hsa-miR-206
F08	hsa-miR-211-5p
F09	hsa-miR-26b-5p
F10	hsa-miR-30e-5p
F11	hsa-miR-372-3p
F12	hsa-miR-373-3p
G01	hsa-miR-374a-5p
G02	hsa-miR-376c-3p
G03	hsa-miR-7-5p
G04	hsa-miR-96-5p
G05	hsa-miR-103a-3p
G06	hsa-miR-15b-5p
G07	hsa-miR-16-5p
G08	hsa-miR-191-5p
G09	hsa-miR-22-3p
G10	hsa-miR-24-3p
G11	hsa-miR-26a-5p
G12	hsa-miR-31-5p

Приложение 5. Списък на миРНК-ите, включени в Human miFinder miRNA PCR Array

Позиция в плаката	МиРНК праймер
A01	hsa-miR-142-5p
A02	hsa-miR-9-5p
A03	hsa-miR-150-5p
A04	hsa-miR-27b-3p
A05	hsa-miR-101-3p
A06	hsa-let-7d-5p
A07	hsa-miR-103a-3p
A08	hsa-miR-16-5p
A09	hsa-miR-26a-5p
A10	hsa-miR-32-5p
A11	hsa-miR-26b-5p
A12	hsa-let-7g-5p
B01	hsa-miR-30c-5p
B02	hsa-miR-96-5p
B03	hsa-miR-185-5p
B04	hsa-miR-142-3p
B05	hsa-miR-24-3p
B06	hsa-miR-155-5p
B07	hsa-miR-146a-5p
B08	hsa-miR-425-5p
B09	hsa-miR-181b-5p
B10	hsa-miR-302b-3p
B11	hsa-miR-30b-5p
B12	hsa-miR-21-5p
C01	hsa-miR-30e-5p
C02	hsa-miR-200c-3p
C03	hsa-miR-15b-5p
C04	hsa-miR-223-3p
C05	hsa-miR-194-5p
C06	hsa-miR-210-3p
C07	hsa-miR-15a-5p
C08	hsa-miR-181a-5p
C09	hsa-miR-125b-5p
C10	hsa-miR-99a-5p
C11	hsa-miR-28-5p
C12	hsa-miR-320a
D01	hsa-miR-125a-5p
D02	hsa-miR-29b-3p
D03	hsa-miR-29a-3p
D04	hsa-miR-141-3p
D05	hsa-miR-19a-3p
D06	hsa-miR-18a-5p
D07	hsa-miR-374a-5p

D08	hsa-miR-423-5p
D09	hsa-let-7a-5p
D10	hsa-miR-124-3p
D11	hsa-miR-92a-3p
D12	hsa-miR-23a-3p
E01	hsa-miR-25-3p
E02	hsa-let-7e-5p
E03	hsa-miR-376c-3p
E04	hsa-miR-126-3p
E05	hsa-miR-144-3p
E06	hsa-miR-424-5p
E07	hsa-miR-30a-5p
E08	hsa-miR-23b-3p
E09	hsa-miR-151a-5p
E10	hsa-miR-195-5p
E11	hsa-miR-143-3p
E12	hsa-miR-30d-5p
F01	hsa-miR-191-5p
F02	hsa-let-7i-5p
F03	hsa-miR-302a-3p
F04	hsa-miR-222-3p
F05	hsa-let-7b-5p
F06	hsa-miR-19b-3p
F07	hsa-miR-106a-5p hsa-miR-17-5p
F08	hsa-miR-93-5p
F09	hsa-miR-186-5p
F10	hsa-miR-196b-5p
F11	hsa-miR-27a-3p
F12	hsa-miR-22-3p
G01	hsa-miR-130a-3p
G02	hsa-let-7c-5p
G03	hsa-miR-29c-3p
G04	hsa-miR-140-3p
G05	hsa-miR-128-3p
G06	hsa-let-7f-5p
G07	hsa-miR-122-5p
G08	hsa-miR-20a-5p
G09	hsa-miR-106b-5p
G10	hsa-miR-7-5p
G11	hsa-miR-100-5p
G12	hsa-miR-302c-3p

X. Литературни източници

1. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Hum Reprod. 2005;20(10):2698-704.
2. Gupta S, Harlev A, Agarwal A. Endometriosis: A Comprehensive Update2015.
3. Bulun SE. Endometriosis. New England Journal of Medicine. 2009;360(3):268-79.
4. Brotherson L. Dissertatio medica, inauguralis, de utero et inflammatione ejusdem: quam annuente summo numine : ex auctoritate reverendi admodum viri, D. Gulielmi Robertson S.S.T.P. Academiae Edinburgenae Praefecti : nec non amplissimi senatus academici consensu et nobilissimae facultatis medicae decreto : pro gradu doctoratus, summisque in medicina honoribus et privilegiis rite et legitime consequendis, eruditorum examini summittit: Apud Balfour et Smellie, Academiae Typographos; 1776.
5. Benagiano G, Brosens I. The history of endometriosis: identifying the disease. Hum Reprod. 1991;6(7):963-8.
6. Batt R. A History of Endometriosis: Springer London; 2011.
7. von Rokitansky KF. Ueber Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen: Druck von Carl Ueberreuter; 1860.
8. Nezhat C, Nezhat F, Nezhat C. Endometriosis: ancient disease, ancient treatments. Fertility and Sterility. 2012;98(6).
9. Dixon LS. Perilous Chastity: Women and Illness in Pre-Enlightenment Art and Medicine: Cornell University Press; 2019.
10. Wyke M, Fischler S, Archer LoJ. Women in ancient societies: an illusion of the night. Basingstoke: Macmillan; 1994. xx, 308 p., [4] p. of plates p.
11. McClure LK. Sexuality and Gender in the Classical World: Readings and Sources: Wiley; 2008.
12. Rosario VA. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences. 1995;50(3):418-20.
13. Temkin O, Eastman NJ. Soranus' Gynecology: Johns Hopkins University Press; 1991.
14. King H. Hippocrates' Woman: Reading the Female Body in Ancient Greece: Routledge; 1998.
15. Carroll JL, Stewart AG, Stewart PAG. Saints, Sinners, and Sisters: Gender and Northern Art in Medieval and Early Modern Europe: Ashgate; 2003.
16. Gilman SL, Gilman SL, Freud S, King H, Porter R, Rousseau GS, et al. Hysteria Beyond Freud: University of California Press; 1993.
17. Micklem N. The Nature of Hysteria: Routledge; 1995.
18. Rosenberg C. Hysteria: The History of a Disease. Ilza Veith. University of Chicago Press, Chicago, 1965. 328 pp. Illus. $7.95. Science. 1965;150(3694):330-.
19. Faber D. Hysteria in the Eighteenth Century. 2007. p. 321-30.
20. Lindemann M. Sex, Religion, and the Making of Modern Madness: The Eberbach Asylum and German Society, 1815–1849. By Ann Goldberg. New York: Oxford University Press. 1999. Pp. 236. $35.00. ISBN 0-19-512581-9. Central European History. 2008;35(1):100-2.
21. Bernutz G. Clinical memoirs on the diseases of women. Goupil E, Meadows A, editors. London: New Sydenham Society; 1866.
22. Porter R. The Greatest Benefit to Mankind: A Medical History of Humanity from Antiquity to the Present: Fontana Press; 1999.
23. Ranking WH, Radcliffe CB, Stone WD. The Half-yearly Abstract of the Medical Sciences: Being a Digest of British and Continental Medicine, and of the Progress of Medicine and the Collateral Sciences: H. C. Lea; 1849.
24. M'Clintock AH. Clinical memoirs on diseases of women. Dublin: Fannin; 1863.
25. Hudelist G, Keckstein J, Wright JT. The migrating adenomyoma: past views on the etiology of adenomyosis and endometriosis. Fertil Steril. 2009;92(5):1536-43.

26. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. Am J Pathol. 1927;3(2):93-110 43.
27. Counseller VS, Crenshaw JL, Jr. A clinical and surgical review of endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1951;62(4):930-42.
28. HENRIKSEN E. PRIMARY ENDOMETRIOSIS OF THE URINARY BLADDER: REPORT OF ONE CASE. Journal of the American Medical Association. 1935;104(16):1401-3.
29. Fallon J. Endometriosis in youth. J Am Med Assoc. 1946;131:1405.
30. Friedman L. Perirectosigmoid endometriosis simulating carcinoma. The American Journal of Surgery. 1936;33(2):298-301.
31. Junod SW, Marks L. Women's trials: the approval of the first oral contraceptive pill in the United States and Great Britain. J Hist Med Allied Sci. 2002;57(2):117-60.
32. Nezhat C, Crowgey SR, Garrison CP. Surgical treatment of endometriosis via laser laparoscopy. Fertil Steril. 1986;45(6):778-83.
33. Hornung D, Ryan IP, Chao VA, Vigne JL, Schriock ED, Taylor RN. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(5):1621-8.
34. Rogers PA, D'Hooghe TM, Fazleabas A, Gargett CE, Giudice LC, Montgomery GW, et al. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. Reprod Sci. 2009;16(4):335-46.
35. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. Am J Epidemiol. 2004;160(8):784-96.
36. Brosens I, Gordts S, Benagiano G. Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion. Hum Reprod. 2013;28(8):2026-31.
37. Suvitie PA, Hallamaa MK, Matomäki JM, Mäkinen JI, Perheentupa AH. Prevalence of Pain Symptoms Suggestive of Endometriosis Among Finnish Adolescent Girls (TEENMAPS Study). J Pediatr Adolesc Gynecol. 2016;29(2):97-103.
38. Williams C, Long AJ, Noga H, Allaire C, Bedaiwy MA, Lisonkova S, et al. East and South East Asian Ethnicity and Moderate-to-Severe Endometriosis. J Minim Invasive Gynecol. 2019;26(3):507-15.
39. Verkauf BS. Incidence, symptoms, and signs of endometriosis in fertile and infertile women. J Fla Med Assoc. 1987;74(9):671-5.
40. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Endometriosis and infertility: a committee opinion. Fertil Steril. 2012;98(3):591-8.
41. Shafrir AL, Farland LV, Shah DK, Harris HR, Kvaskoff M, Zondervan K, et al. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018;51:1-15.
42. Sapkota Y, Steinthorsdottir V, Morris AP, Fassbender A, Rahmioglu N, De Vivo I, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. Nature communications. 2017;8:15539-.
43. Harris HR, Costenbader KH, Mu F, Kvaskoff M, Malspeis S, Karlson EW, et al. Endometriosis and the risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study II. Ann Rheum Dis. 2016;75(7):1279-84.
44. Nielsen NM, Jørgensen KT, Pedersen BV, Rostgaard K, Frisch M. The co-occurrence of endometriosis with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. Human reproduction (Oxford, England). 2011;26(6):1555-9.
45. Alderman MH, 3rd, Yoder N, Taylor HS. The Systemic Effects of Endometriosis. Semin Reprod Med. 2017;35(3):263-70.
46. Wang C, Liang Z, Liu X, Zhang Q, Li S. The Association between Endometriosis, Tubal Ligation, Hysterectomy and Epithelial Ovarian Cancer: Meta-Analyses. International journal of environmental research and public health. 2016;13(11):1138.
47. Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, Harris HR, Poole EM, Farland L, et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? Hum Reprod Update. 2015;21(4):500-16.

48. Marian S, Hermanowicz-Szamatowicz K. Endometriosis - a decade later - still an enigmatic disease. What is the new in the diagnosis and treatment? Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2020;36(2):104-8.
49. Simmen R, Quick C, Kelley A, Zheng W. Endometriosis and Endometriosis-Associated Tumors. 2019. p. 405-26.
50. Nezhat C, Li A, Falik R, Copeland D, Razavi G, Shakib A, et al. Bowel endometriosis: diagnosis and management. Am J Obstet Gynecol. 2018;218(6):549-62.
51. Machairiotis N, Stylianaki A, Dryllis G, Zarogoulidis P, Kouroutou P, Tsiamis N, et al. Extrapelvic endometriosis: a rare entity or an under diagnosed condition? Diagnostic pathology. 2013;8:194-.
52. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril. 1997;67(5):817-21.
53. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. Zentralbl Gynakol. 2005;127(5):275-81.
54. Haas D, Wurm P, Shamiyeh A, Shebl O, Chvatal R, Oppelt P. Efficacy of the revised Enzian classification: a retrospective analysis. Does the revised Enzian classification solve the problem of duplicate classification in rASRM and Enzian? Arch Gynecol Obstet. 2013;287(5):941-5.
55. Haas D, Chvatal R, Habelsberger A, Wurm P, Schimetta W, Oppelt P. Comparison of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. Fertil Steril. 2011;95(5):1574-8.
56. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. Fertility and Sterility. 2010;94(5):1609-15.
57. Tomassetti C, Geysenbergh B, Meuleman C, Timmerman D, Fieuws S, D'Hooghe T. External validation of the endometriosis fertility index (EFI) staging system for predicting non-ART pregnancy after endometriosis surgery. Human Reproduction. 2013;28(5):1280-8.
58. Schliep KC, Mumford SL, Peterson CM, Chen Z, Johnstone EB, Sharp HT, et al. Pain typology and incident endometriosis. Human reproduction (Oxford, England). 2015;30(10):2427-38.
59. Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, Keckstein J, Taylor HS, Abrao MS, et al. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. Hum Reprod. 2017;32(2):315-24.
60. Acién P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. ISRN obstetrics and gynecology. 2013;2013:242149-.
61. Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):9.
62. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. N Engl J Med. 2020;382(13):1244-56.
63. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1927;14(4):422-69.
64. Grümmer R. Animal models in endometriosis research. Hum Reprod Update. 2006;12(5):641-9.
65. D'Hooghe TM, Debrock S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. Hum Reprod Update. 2002;8(1):84-8.
66. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol. 1984;64(2):151-4.
67. Nunley WC, Jr., Kitchin JD, 3rd. Congenital atresia of the uterine cervix with pelvic endometriosis. Arch Surg. 1980;115(6):757-8.
68. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Endometriosis. Annu Rev Pathol. 2020;15:71-95.
69. Gruenwald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1942;44(3):470-4.
70. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil Steril. 2012;98(3):511-9.
71. Sourial S, Tempest N, Hapangama DK. Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. International Journal of Reproductive Medicine. 2014;2014:179515.
72. Figueira PG, Abrão MS, Krikun G, Taylor HS. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. Ann N Y Acad Sci. 2011;1221(1):10-7.

73. Kato K. Stem cells in human normal endometrium and endometrial cancer cells: characterization of side population cells. Kaohsiung J Med Sci. 2012;28(2):63-71.
74. Tsuji S, Yoshimoto M, Takahashi K, Noda Y, Nakahata T, Heike T. Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. Fertility and Sterility. 2008;90(4, Supplement):1528-37.
75. Tampaki EC, Tampakis A, Kontzoglou K, Kouraklis G. Commentary: Somatic Stem Cells and Their Dysfunction in Endometriosis. Front Surg. 2017;4:37.
76. Valentijn AJ, Palial K, Al-Lamee H, Tempest N, Drury J, Von Zglinicki T, et al. SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis. Hum Reprod. 2013;28(10):2695-708.
77. Gil-Sanchis C, Cervelló I, Mas A, Faus A, Pellicer A, Simón C. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5) as a putative human endometrial stem cell marker. Mol Hum Reprod. 2013;19(7):407-14.
78. Nguyen HPT, Xiao L, Deane JA, Tan KS, Cousins FL, Masuda H, et al. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. Hum Reprod. 2017;32(11):2254-68.
79. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Hum Reprod Update. 2016;22(2):137-63.
80. Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T, Benny O, Zaslavsky A, Zurakowski D, et al. Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. Am J Pathol. 2011;178(4):1782-91.
81. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, et al. Role of estrogen receptor-β in endometriosis. Semin Reprod Med. 2012;30(1):39-45.
82. Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P, et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. Biol Reprod. 2007;77(4):681-7.
83. Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR, Word RA, Mendelson CR. Inflammatory status influences aromatase and steroid receptor expression in endometriosis. Endocrinology. 2008;149(3):1190-204.
84. Smuc T, Hevir N, Ribic-Pucelj M, Husen B, Thole H, Rizner TL. Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. Mol Cell Endocrinol. 2009;301(1-2):59-64.
85. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. Nat Rev Endocrinol. 2014;10(5):261-75.
86. Han SJ, Jung SY, Wu SP, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S, et al. Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. Cell. 2015;163(4):960-74.
87. Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, et al. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(2):623-31.
88. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(12):4474-80.
89. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(8):2897-902.
90. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. Endocr Rev. 2019;40(4):1048-79.
91. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ulmann A, Baulieu EE, Yen SS. Treatment of endometriosis with the antiprogesterone mifepristone (RU486). Fertil Steril. 1996;65(1):23-8.
92. Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. Endocr Rev. 2005;26(3):423-38.
93. Shigesi N, Kvaskoff M, Kirtley S, Feng Q, Fang H, Knight JC, et al. The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2019;25(4):486-503.
94. Symons LK, Miller JE, Kay VR, Marks RM, Liblik K, Koti M, et al. The Immunopathophysiology of Endometriosis. Trends Mol Med. 2018;24(9):748-62.

95. Kyama CM, Mihalyi A, Simsa P, Falconer H, Fulop V, Mwenda JM, et al. Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. Front Biosci (Elite Ed). 2009;1:444-54.
96. Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V, Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2007;12(3):194-202.
97. Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. Hum Reprod Update. 2013;19(4):406-18.
98. Kang YJ, Jeung IC, Park A, Park YJ, Jung H, Kim TD, et al. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. Hum Reprod. 2014;29(10):2176-89.
99. Beste MT, Pfäffle-Doyle N, Prentice EA, Morris SN, Lauffenburger DA, Isaacson KB, et al. Molecular network analysis of endometriosis reveals a role for c-Jun-regulated macrophage activation. Sci Transl Med. 2014;6(222):222ra16.
100. Donnez O, Van Langendonckt A, Defrère S, Colette S, Van Kerk O, Dehoux J-P, et al. Induction of endometriotic nodules in an experimental baboon model mimicking human deep nodular lesions. Fertility and Sterility. 2013;99(3):783-9.e3.
101. Laux-Biehlmann A, d'Hooghe T, Zollner TM. Menstruation pulls the trigger for inflammation and pain in endometriosis. Trends Pharmacol Sci. 2015;36(5):270-6.
102. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. Science. 2005;308(5728):1587-9.
103. Forster R, Sarginson A, Velichkova A, Hogg C, Dorning A, Horne AW, et al. Macrophage-derived insulin-like growth factor-1 is a key neurotrophic and nerve-sensitizing factor in pain associated with endometriosis. Faseb j. 2019;33(10):11210-22.
104. Nisenblat V. Circulating microRNAs in endometriosis. University of Adelaide, School of Paediatrics and Reproductive Health. 2013(2013).
105. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. Endocrinology. 2003;144(7):2870-81.
106. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(1):174-9.
107. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(2):600-6.
108. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. Hum Reprod. 2001;16(3):561-6.
109. Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? Gynecol Obstet Invest. 2006;62(3):139-47.
110. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. Lancet. 2004;364(9447):1789-99.
111. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. Reprod Biomed Online. 2006;13(1):126-34.
112. Wei Q, St Clair JB, Fu T, Stratton P, Nieman LK. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. Fertil Steril. 2009;91(5):1686-91.
113. Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. Fertil Steril. 1988;50(4):573-9.
114. Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, et al. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1997;176(3):593-7.
115. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. Fertil Steril. 2001;76(2):223-31.
116. Olovsson M. Immunological Aspects of Endometriosis: An Update. American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989). 2011;66 Suppl 1:101-4.
117. Gupta S, Agarwal A, Sekhon L, Krajcir N, Cocuzza M, Falcone T. Serum and peritoneal abnormalities in endometriosis: potential use as diagnostic markers. Minerva Ginecol. 2006;58(6):527-51.

118. Pasoto SG, Abrao MS, Podgaec S, Bonfa E. Chapter 10 Endometriosis and Autoimmunity. In: Walker SE, Jara LJ, editors. Handbook of Systemic Autoimmune Diseases. 9: Elsevier; 2008. p. 103-11.
119. Saha R, Pettersson HJ, Svedberg P, Olovsson M, Bergqvist A, Marions L, et al. Heritability of endometriosis. Fertil Steril. 2015;104(4):947-52.
120. Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am. 2003;30(1):41-61.
121. Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. Am J Hum Genet. 2005;77(3):365-76.
122. Rahmioglu N, Banasik K, Christofidou P, Danning R, Galarneau G, Giri A, et al. Large-scale genome-wide association meta-analysis of endometriosis reveals 13 novel loci and genetically-associated comorbidity with other pain conditions2018.
123. Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, Ishiguro T, Tamura R, Mori Y, et al. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. Cell Rep. 2018;24(7):1777-89.
124. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlings HM, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. New England Journal of Medicine. 2017;376(19):1835-48.
125. Lac V, Nazeran TM, Tessier-Cloutier B, Aguirre-Hernandez R, Albert A, Lum A, et al. Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal? J Pathol. 2019;249(2):173-81.
126. Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(8):3261-7.
127. Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, Harada T. Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. Front Biosci (Elite Ed). 2013;5:900-10.
128. Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P, Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 2005;193(2):371-80.
129. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013;200(4):373-83.
130. Finn NA, Eapen D, Manocha P, Al Kassem H, Lassegue B, Ghasemzadeh N, et al. Coronary heart disease alters intercellular communication by modifying microparticle-mediated microRNA transport. FEBS letters. 2013;587(21):3456-63.
131. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. Front Genet. 2013;4:173.
132. Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. Mol Endocrinol. 2009;23(2):265-75.
133. Eggers JC, Martino V, Reinbold R, Schäfer SD, Kiesel L, Starzinski-Powitz A, et al. microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4. Reprod Biomed Online. 2016;32(4):434-45.
134. Ballard KD, Seaman HE, de Vries CS, Wright JT. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study--Part 1. Bjog. 2008;115(11):1382-91.
135. Sinaii N, Plumb K, Cotton L, Lambert A, Kennedy S, Zondervan K, et al. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. Fertility and sterility. 2008;89(3):538-45.
136. Hurd WW. Criteria that indicate endometriosis is the cause of chronic pelvic pain. Obstet Gynecol. 1998;92(6):1029-32.
137. Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. Hum Reprod. 2001;16(12):2668-71.

138. Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Bréart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. Hum Reprod. 2003;18(4):760-6.
139. Seracchioli R, Mabrouk M, Guerrini M, Manuzzi L, Savelli L, Frascà C, et al. Dyschezia and posterior deep infiltrating endometriosis: analysis of 360 cases. J Minim Invasive Gynecol. 2008;15(6):695-9.
140. Thomassin I, Bazot M, Detchev R, Barranger E, Cortez A, Darai E. Symptoms before and after surgical removal of colorectal endometriosis that are assessed by magnetic resonance imaging and rectal endoscopic sonography. Am J Obstet Gynecol. 2004;190(5):1264-71.
141. Muse KN, Wilson EA. How does mild endometriosis cause infertility? Fertil Steril. 1982;38(2):145-52.
142. Pessoa de Farias Rodrigues M, Lima Vilarino F, de Souza Barbeiro Munhoz A, da Silva Paiva L, de Alcantara Sousa LV, Zaia V, et al. Clinical aspects and the quality of life among women with endometriosis and infertility: a cross-sectional study. BMC Women's Health. 2020;20(1):124.
143. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? Semin Reprod Med. 2003;21(2):243-54.
144. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. Fertil Steril. 2009;92(1):68-74.
145. Xu B, Guo N, Zhang X-m, Shi W, Tong X-h, Iqbal F, et al. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. Scientific reports. 2015;5:10779-.
146. Culley L, Law C, Hudson N, Denny E, Mitchell H, Baumgarten M, et al. The social and psychological impact of endometriosis on women's lives: a critical narrative review. Hum Reprod Update. 2013;19(6):625-39.
147. Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. BMC Womens Health. 2014;14:123.
148. Irungu S, Mavrelos D, Worthington J, Blyuss O, Saridogan E, Timms JF. Discovery of non-invasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis. Clinical Proteomics. 2019;16(1):14.
149. Ballard K, Lowton K, Wright J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. Fertil Steril. 2006;86(5):1296-301.
150. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. Hum Reprod. 1996;11(4):878-80.
151. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Rabischong B, Botchorishvili R, Mage G. Relationship between delay of surgical diagnosis and severity of disease in patients with symptomatic deep infiltrating endometriosis. Fertil Steril. 2006;86(5):1314-6; discussion 7.
152. Stovall DW, Bowser LM, Archer DF, Guzick DS. Endometriosis-associated pelvic pain: evidence for an association between the stage of disease and a history of chronic pelvic pain. Fertil Steril. 1997;68(1):13-8.
153. Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P. Invasive and noninvasive methods for the diagnosis of endometriosis. Clinical obstetrics and gynecology. 2010;53(2):413-9.
154. Parasar P, Ozcan P, Terry KL. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. Current obstetrics and gynecology reports. 2017;6(1):34-41.
155. Moore J, Copley S, Morris J, Lindsell D, Golding S, Kennedy S. A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2002;20(6):630-4.
156. Bazot M, Thomassin I, Hourani R, Cortez A, Darai E. Diagnostic accuracy of transvaginal sonography for deep pelvic endometriosis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2004;24(2):180-5.
157. Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Daraï E. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. Fertil Steril. 2009;92(6):1825-33.
158. Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. Eur Radiol. 2006;16(2):285-98.
159. Biscaldi E, Ferrero S, Fulcheri E, Ragni N, Remorgida V, Rollandi GA. Multislice CT enteroclysis in the diagnosis of bowel endometriosis. Eur Radiol. 2007;17(1):211-9.

160. Ribeiro HS, Ribeiro PA, Rossini L, Rodrigues FC, Donadio N, Aoki T. Double-contrast barium enema and transrectal endoscopic ultrasonography in the diagnosis of intestinal deeply infiltrating endometriosis. J Minim Invasive Gynecol. 2008;15(3):315-20.
161. Kiesel L, Sourouni M. Diagnosis of endometriosis in the 21st century. Climacteric. 2019;22(3):296-302.
162. Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. Am J Obstet Gynecol. 2001;184(7):1407-11; discussion 11-3.
163. Wykes CB, Clark TJ, Khan KS. Accuracy of laparoscopy in the diagnosis of endometriosis: a systematic quantitative review. Bjog. 2004;111(11):1204-12.
164. Liu E, Nisenblat V, Farquhar C, Fraser I, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2015;2015(12):CD012019-CD.
165. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis †. Human Reproduction. 2014;29(3):400-12.
166. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69(3):89-95.
167. Rogers PA, D'Hooghe TM, Fazleabas A, Giudice LC, Montgomery GW, Petraglia F, et al. Defining future directions for endometriosis research: workshop report from the 2011 World Congress of Endometriosis in Montpellier, France. Reproductive sciences. 2013;20(5):483-99.
168. Fassbender A, Dorien O, De Moor B, Waelkens E, Meuleman C, Tomassetti C, et al. Biomarkers of endometriosis. Endometriosis. 2014:321-39.
169. Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, Lebovic D, Waelkens E, De Moor B, et al. Biomarkers of endometriosis. Fertil Steril. 2013;99(4):1135-45.
170. Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. Journal of proteome research. 2011;10(1):5-16.
171. May K, Conduit-Hulbert S, Villar J, Kirtley S, Kennedy S, Becker C. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. Human reproduction update. 2010;16(6):651-74.
172. Fassbender A, Burney RO, F. O D, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. BioMed Research International. 2015;2015:130854.
173. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. Human reproduction update. 2010;16(6):651-74.
174. Socolov R, Butureanu S, Angioni S, Sindilar A, Boiculese L, Cozma L, et al. The value of serological markers in the diagnosis and prognosis of endometriosis: a prospective case-control study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011;154(2):215-7.
175. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. Fertil Steril. 1998;70(6):1101-8.
176. He R-H, Yao W-M, Wu L-Y, Mao Y-Y. Highly elevated serum CA-125 levels in patients with non-malignant gynecological diseases. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2011;283(1):107-10.
177. Mabrouk M, Elmakky A, Caramelli E, Farina A, Mignemi G, Venturoli S, et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. Arch Gynecol Obstet. 2012;285(5):1307-12.
178. Agic A, Djalali S, Wolfler MM, Halis G, Diedrich K, Hornung D. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. Reprod Sci. 2008;15(9):906-11.
179. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, Simsa P, Pochet N, De Smet F, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. Human Reproduction. 2009;25(3):654-64.
180. Othman EE-DR, Hornung D, Al-Hendy A. Biomarkers of endometriosis. Expert Opinion on Medical Diagnostics. 2008;2(7):741-52.
181. Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V, Stojko R. Serum and peritoneal fluid immunological markers in adolescent girls with chronic pelvic pain. Obstet Gynecol Surv. 2012;67(6):374-81.

182. Tuten A, Kucur M, Imamoglu M, Kaya B, Acikgoz AS, Yilmaz N, et al. Copeptin is associated with the severity of endometriosis. Arch Gynecol Obstet. 2014;290(1):75-82.
183. Kocbek V, Vouk K, Mueller MD, Rižner TL, Bersinger NA. Elevated glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2013;29(5):455-9.
184. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. Ann N Y Acad Sci. 2002;955:89-100; discussion 18, 396-406.
185. Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. Microvasc Res. 2007;74(2-3):121-30.
186. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Altered circulating levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors and effect of progesterone supplementation in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril. 2013;100(1):127-34.e1.
187. Lessey BA, Young SL. Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis. Semin Reprod Endocrinol. 1997;15(3):291-9.
188. Kyama CM, Mihalyi A, Gevaert O, Waelkens E, Simsa P, Van de Plas R, et al. Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. Fertil Steril. 2011;95(4):1338-43.e1-3.
189. Gupta D, Hull ML, Fraser I, Miller L, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2016;4(4):CD012165-CD.
190. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
191. Agrawal S, Tapmeier T, Rahmioglu N, Kirtley S, Zondervan K, Becker C. The miRNA Mirage: How Close Are We to Finding a Non-Invasive Diagnostic Biomarker in Endometriosis? A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2018;19(2).
192. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem. 2010;56(11):1733-41.
193. Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. Hum Reprod Update. 2010;16(2):142-65.
194. Matsuzaki S, Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. Hum Reprod. 2012;27(3):712-21.
195. Anastasiu CV, Moga MA, Elena Neculau A, Bălan A, Scârneciu I, Dragomir RM, et al. Biomarkers for the Noninvasive Diagnosis of Endometriosis: State of the Art and Future Perspectives. Int J Mol Sci. 2020;21(5).
196. Zheng B, Xue X, Zhao Y, Chen J, Xu C-Y, Duan P. The differential expression of microRNA-143,145 in endometriosis. Iranian journal of reproductive medicine. 2014;12(8):555-60.
197. Rafique S, Decherney AH. Medical Management of Endometriosis. Clinical obstetrics and gynecology. 2017;60(3):485-96.
198. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current genomics. 2010;11(7):537-61.
199. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402.
200. Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. Molecular Aspects of Medicine. 2020;72:100825.
201. Horvitz HR, Sulston JE. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. Genetics. 1980;96(2):435-54.
202. Ambros V, Horvitz HR. The lin-14 locus of Caenorhabditis elegans controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. Genes Dev. 1987;1(4):398-414.
203. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.

204. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. Cell. 2004;116(2 Suppl):S89-92, 1 p following S6.
205. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001;294(5543):862-4.
206. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294(5543):853-8.
207. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. Rna. 2003;9(3):277-9.
208. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic acids research. 2006;34(Database issue):D140-4.
209. Wright MW, Bruford EA. Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. Hum Genomics. 2011;5(2):90-8.
210. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. 2004;14(10a):1902-10.
211. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. Rna. 2005;11(3):241-7.
212. Hammond SM. An overview of microRNAs. Adv Drug Deliv Rev. 2015;87:3-14.
213. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna. 2004;10(12):1957-66.
214. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature. 2004;432(7014):231-5.
215. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. Nature. 2015;519(7544):482-5.
216. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 2004;18(24):3016-27.
217. Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. Trends Biochem Sci. 2010;35(7):368-76.
218. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell. 2005;123(4):607-20.
219. Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, et al. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(6):650-7.
220. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014;15(8):509-24.
221. Ohanian M, Humphreys DT, Anderson E, Preiss T, Fatkin D. A heterozygous variant in the human cardiac miR-133 gene, MIR133A2, alters miRNA duplex processing and strand abundance. BMC genetics. 2013;14:18-.
222. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature. 2007;448(7149):83-6.
223. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. Genes Dev. 2008;22(20):2773-85.
224. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(34):15163-8.
225. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell. 2003;115(7):787-98.
226. Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. Genes & development. 2005;19(9):1067-80.
227. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell. 2007;27(1):91-105.
228. Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. Mol Cell. 2015;59(1):117-24.
229. Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. Science. 2010;328(5985):1534-9.

230. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. Nature Reviews Genetics. 2015;16(7):421-33.
231. Christie M, Boland A, Huntzinger E, Weichenrieder O, Izaurralde E. Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. Mol Cell. 2013;51(3):360-73.
232. Braun JE, Huntzinger E, Izaurralde E. The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing. Adv Exp Med Biol. 2013;768:147-63.
233. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(6):586-93.
234. Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, Schroeder JC, Lee JH, LeTonqueze O, et al. MicroRNA-mediated mRNA Translation Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear microRNP. Scientific Reports. 2012;2(1):842.
235. Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. Cell. 2007;128(6):1105-18.
236. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell. 2008;30(4):460-71.
237. Nishi K, Nishi A, Nagasawa T, Ui-Tei K. Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. RNA (New York, NY). 2013;19(1):17-35.
238. Benhamed M, Herbig U, Ye T, Dejean A, Bischof O. Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. Nat Cell Biol. 2012;14(3):266-75.
239. Pitchiaya S, Heinicke LA, Park JI, Cameron EL, Walter NG. Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution. Cell Rep. 2017;19(3):630-42.
240. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res. 2008;18(10):997-1006.
241. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(12):5003-8.
242. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. PLoS One. 2012;7(3):e30679.
243. Iftikhar H, Carney GE. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. Bioessays. 2016;38(4):367-78.
244. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature Cell Biology. 2011;13(4):423-33.
245. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. Nucleic acids research. 2010;38(20):7248-59.
246. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. Trends Biochem Sci. 2012;37(11):460-5.
247. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. J Biol Chem. 2010;285(23):17442-52.
248. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. Mol Cancer. 2011;10:117.
249. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding WQ. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). Mol Cancer. 2015;14:133.
250. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. Cancer Cell. 2014;25(4):501-15.
251. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. Trends Cell Biol. 2012;22(3):125-32.
252. Ekimler S, Sahin K. Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. Genes (Basel). 2014;5(3):671-83.

253. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic acids research. 2011;39(Database issue):D152-7.
254. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. RNA biology. 2007;4(2):76-84.
255. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA–mRNA interaction maps. Nature. 2009;460(7254):479-86.
256. Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, et al. A biochemical approach to identifying microRNA targets. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(49):19291-6.
257. Leung AK, Young AG, Bhutkar A, Zheng GX, Bosson AD, Nielsen CB, et al. Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(2):237-44.
258. Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, et al. Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. PLoS Genet. 2011;7(11):e1002363.
259. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. Nature. 2008;455(7209):64-71.
260. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. Molecular cell. 2014;56(1):104-15.
261. Diao L, Marcais A, Norton S, Chen KC. MixMir: microRNA motif discovery from gene expression data using mixed linear models. Nucleic acids research. 2014;42(17):e135.
262. van Dongen S, Abreu-Goodger C, Enright AJ. Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. Nat Methods. 2008;5(12):1023-5.
263. Gillespie P, Ladame S, O'Hare D. Molecular methods in electrochemical microRNA detection. Analyst. 2019;144(1):114-29.
264. Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. F1000Res. 2013;2:136.
265. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. Cells. 2020;9(2):276.
266. Chen C, Tan R, Wong L, Fekete R, Halsey J. Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. Methods Mol Biol. 2011;687:113-34.
267. Chen C, Ridzon D, Broomer A, Zhou Z, Lee D, Nguyen J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic acids research. 2005;33:e179.
268. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. EMBO Mol Med. 2012;4(3):143-59.
269. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(15):6982-7.
270. de Planell-Saguer M, Rodicio MC, Mourelatos Z. Rapid in situ codetection of noncoding RNAs and proteins in cells and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections without protease treatment. Nat Protoc. 2010;5(6):1061-73.
271. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic acids research. 2005;33(20):e179.
272. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. Nat Rev Genet. 2012;13(5):358-69.
273. Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, Willenbring H. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. J Clin Invest. 2012;122(3):1097-108.
274. Freilich RW, Woodbury ME, Ikezu T. Integrated expression profiles of mRNA and miRNA in polarized primary murine microglia. PLoS One. 2013;8(11):e79416.
275. Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2012;10(5):246-53.

276. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. Immune Netw. 2011;11(6):309-23.
277. Calin GA, Vasilescu C, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Genetic chaos and antichaos in human cancers. Med Hypotheses. 2003;60(2):258-62.
278. Ling H, Zhang W, Calin GA. Principles of microRNA involvement in human cancers. Chin J Cancer. 2011;30(11):739-48.
279. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 2006;6(3):184-92.
280. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005;65(14):6029-33.
281. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(39):13944-9.
282. Zhan MX, Li Y, Hu BS, Shao PJ, Meng QW, He X, et al. [Expression of serum microRNAs (miR-222, miR-181, miR-216) in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2013;93(23):1830-2.
283. Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, Han T, Ross SA, Rusyn I, et al. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. Lab Invest. 2010;90(10):1437-46.
284. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science. 2010;327(5962):198-201.
285. Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. Brain. 2009;132(Pt 12):3342-52.
286. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(33):12481-6.
287. Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, et al. Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. J Infect Dis. 2009;200(6):916-25.
288. Institute of Medicine Forum on Drug Discovery D, Translation. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Emerging Safety Science: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright © 2008, National Academy of Sciences.; 2008.

289. Taylor CR. Introduction to Predictive Biomarkers: Definitions and Characteristics. In: Badve S, Kumar GL, editors. Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 3-18.
290. Häusler SFM, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. British Journal of Cancer. 2010;103(5):693-700.
291. Hasanzadeh M, Movahedi M, Rejali M, Maleki F, Moetamani-Ahmadi M, Seifi S, et al. The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer. J Cell Physiol. 2019;234(2):1289-94.
292. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol. 2008;141(5):672-5.
293. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(7):2257-61.
294. Magee P, Shi L, Garofalo M. Role of microRNAs in chemoresistance. Ann Transl Med. 2015;3(21):332.

295. Shen Y, Wang P, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, et al. miR-375 is upregulated in acquired paclitaxel resistance in cervical cancer. Br J Cancer. 2013;109(1):92-9.
296. Yu L, Xiong J, Guo L, Miao L, Liu S, Guo F. The effects of lanthanum chloride on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells: involvement of let-7a and miR-34a microRNAs. Biometals. 2015;28(5):879-90.
297. Yang Y, Liu H, Wang X, Chen L. Up-regulation of microRNA-664 inhibits cell growth and increases cisplatin sensitivity in cervical cancer. Int J Clin Exp Med. 2015;8(10):18123-9.
298. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. Circ Cardiovasc Genet. 2010;3(6):499-506.
299. Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. Exp Gerontol. 2015;72:230-8.
300. Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J. MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. PLOS ONE. 2014;9(2):e88566.
301. Dong J, Liu Y, Liao W, Liu R, Shi P, Wang L. miRNA-223 is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. Journal of bone oncology. 2016;5(2):74-9.
302. Xu J, Yao Q, Hou Y, Xu M, Liu S, Yang L, et al. MiR-223/Ect2/p21 signaling regulates osteosarcoma cell cycle progression and proliferation. Biomed Pharmacother. 2013;67(5):381-6.
303. Liu X, Liu P, Chernock RD, Yang Z, Lang Kuhs KA, Lewis JS, et al. A MicroRNA Expression Signature as Prognostic Marker for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. J Natl Cancer Inst. 2020.
304. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res. 2004;64(11):3753-6.
305. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;353(17):1793-801.
306. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nature Reviews Drug Discovery. 2017;16(3):203-22.
307. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. Nature Reviews Drug Discovery. 2014;13(8):622-38.
308. Walayat A, Yang M, Xiao D. Therapeutic Implication of miRNA in Human Disease. 2018.
309. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. J Adv Res. 2021;28:127-38.
310. Ohlsson Teague EMC, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. Human Reproduction Update. 2009;16(2):142-65.
311. Bjorkman S, Taylor HS. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates†. Biol Reprod. 2019;100(5):1135-46.
312. Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. Molecular human reproduction. 2009;15(10):625-31.
313. Wei S, Xu H, Kuang Y. Systematic enrichment analysis of microRNA expression profiling studies in endometriosis. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(5):423-9.
314. Laudanski P, Charkiewicz R, Tolwinska A, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. Profiling of Selected MicroRNAs in Proliferative Eutopic Endometrium of Women with Ovarian Endometriosis. BioMed Research International. 2015;2015:760698.
315. Shi X-Y, Gu L, Chen J, Guo X-R, Shi Y-L. Downregulation of miR-183 inhibits apoptosis and enhances the invasive potential of endometrial stromal cells in endometriosis. International journal of molecular medicine. 2014;33(1):59-67.
316. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 2009;23(2):265-75.

317. Yang YM, Yang WX. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis. Oncotarget. 2017;8(25):41679-89.
318. Choi P-W, Ng S-W. The Functions of MicroRNA-200 Family in Ovarian Cancer: Beyond Epithelial-Mesenchymal Transition. International journal of molecular sciences. 2017;18(6):1207.
319. Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, Wan YW, Luo D, Qian Y, et al. The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. Int J Oncol. 2013;43(2):548-60.
320. He M, Liu Y, Deng X, Qi S, Sun X, Liu G, et al. Down-regulation of miR-200b-3p by low p73 contributes to the androgen-independence of prostate cancer cells. Prostate. 2013;73(10):1048-56.
321. Saare M, Rekker K, Laisk-Podar T, Rahmioglu N, Zondervan K, Salumets A, et al. Challenges in endometriosis miRNA studies - From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863(9):2282-92.
322. Nothnick WB. MicroRNAs and Endometriosis: Distinguishing Drivers from Passengers in Disease Pathogenesis. Semin Reprod Med. 2017;35(2):173-80.
323. Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. Molecular oncology. 2017;11(12):1673-86.
324. Naqvi H, Mamillapalli R, Krikun G, Taylor HS. Endometriosis Located Proximal to or Remote From the Uterus Differentially Affects Uterine Gene Expression. Reprod Sci. 2016;23(2):186-91.
325. Guo Z, Maki M, Ding R, Yang Y, zhang B, Xiong L. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. Scientific Reports. 2014;4(1):5150.
326. Wang L, Huang W, Ren C, Zhao M, Jiang X, Fang X, et al. Analysis of Serum microRNA Profile by Solexa Sequencing in Women With Endometriosis. Reprod Sci. 2016;23(10):1359-70.
327. Jia SZ, Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. Hum Reprod. 2013;28(2):322-30.
328. Moga MA, Bălan A, Dimienescu OG, Burtea V, Dragomir RM, Anastasiu CV. Circulating miRNAs as Biomarkers for Endometriosis and Endometriosis-Related Ovarian Cancer-An Overview. J Clin Med. 2019;8(5).
329. Zhao M, Tang Q, Wu W, Xia Y, Chen D, Wang X. miR-20a contributes to endometriosis by regulating NTN4 expression. Mol Biol Rep. 2014;41(9):5793-7.
330. Wang W-T, Zhao Y-N, Han B-W, Hong S-J, Chen Y-Q. Circulating MicroRNAs Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Analysis as Noninvasive Biomarkers for Endometriosis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013;98(1):281-9.
331. Dai L, Gu L, Di W. MiR-199a attenuates endometrial stromal cell invasiveness through suppression of the IKKβ/NF-κB pathway and reduced interleukin-8 expression. Mol Hum Reprod. 2012;18(3):136-45.
332. Selleck MJ, Senthil M, Wall NR. Making Meaningful Clinical Use of Biomarkers. Biomark Insights. 2017;12:1177271917715236.
333. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. Clin Chem. 2015;61(1):56-63.
334. Xu W, Zhou Y, Xu G, Geng B, Cui Q. Transcriptome analysis reveals non-identical microRNA profiles between arterial and venous plasma. Oncotarget. 2017;8(17):28471-80.
335. Monzo M, Santasusagna S, Moreno I, Martinez F, Hernández R, Muñoz C, et al. Exosomal microRNAs isolated from plasma of mesenteric veins linked to liver metastases in resected patients with colon cancer. Oncotarget. 2017;8(19):30859-69.
336. Cosar E, Mamillapalli R, Moridi I, Duleba A, Taylor HS. Serum MicroRNA Biomarkers Regulated by Simvastatin in a Primate Model of Endometriosis. Reprod Sci. 2019;26(10):1343-50.
337. Cerkovnik P, Perhavec A, Zgajnar J, Novakovic S. Optimization of an RNA isolation procedure from plasma samples. Int J Mol Med. 2007;20(3):293-300.
338. Brown RAM, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ. Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. BMC Biotechnology. 2018;18(1):16.
339. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E. miRNA profiling from blood—challenges and recommendations. Qiagen Scientific article. 2012:1-10.

340. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic acids research. 2011;39(Database issue):D152-D7.
341. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. Nucleic acids research. 2017;46(D1):D239-D45.
342. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. eLife. 2015;4:e05005.
343. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nature Genetics. 2005;37(5):495-500.
344. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nature genetics. 2000;25(1):25-9.
345. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. Nucleic acids research. 2021;49(D1):D325-d34.
346. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic acids research. 2000;28(1):27-30.
347. García-Moreno A, López-Domínguez R, Ramirez-Mena A, Pascual-Montano A, Aparicio-Puerta E, Hackenberg M, et al. GeneCodis 4: Expanding the modular enrichment analysis to regulatory elements. bioRxiv. 2021:2021.04.15.439962.
348. Vitonis AF, Vincent K, Rahmioglu N, Fassbender A, Buck Louis GM, Hummelshoj L, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: II. Clinical and covariate phenotype data collection in endometriosis research. Fertil Steril. 2014;102(5):1223-32.
349. Arruda MS, Petta CA, Abrão MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. Human Reproduction. 2003;18(4):756-9.
350. Fritz MA, Speroff L. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
351. Wei M, Cheng Y, Bu H, Zhao Y, Zhao W. Length of Menstrual Cycle and Risk of Endometriosis: A Meta-Analysis of 11 Case-Control Studies. Medicine. 2016;95(9):e2922.
352. Matalliotakis IM, Cakmak H, Fragouli YG, Goumenou AG, Mahutte NG, Arici A. Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series. Archives of gynecology and obstetrics. 2008;277(5):389-93.
353. Vercellini P, De Giorgi O, Aimi G, Panazza S, Uglietti A, Crosignani PG. Menstrual characteristics in women with and without endometriosis. Obstetrics and gynecology. 1997;90(2):264-8.
354. Peterson CM, Johnstone EB, Hammoud AO, Stanford JB, Varner MW, Kennedy A, et al. Risk factors associated with endometriosis: importance of study population for characterizing disease in the ENDO Study. American journal of obstetrics and gynecology. 2013;208(6):451.e1-11.
355. Nnoaham KE, Webster P, Kumbang J, Kennedy SH, Zondervan KT. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. Fertility and sterility. 2012;98(3):702-12. e6.
356. Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, Brown C, Longcope C, Schatzkin A, et al. Relationships of age and reproductive characteristics with plasma estrogens and androgens in premenopausal women. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1995;4(4):381-6.
357. Zullo F, Spagnolo E, Saccone G, Acunzo M, Xodo S, Ceccaroni M, et al. Endometriosis and obstetrics complications: a systematic review and meta-analysis. Fertility and Sterility. 2017;108(4):667-72.e5.
358. Linnakaari R, Helle N, Mentula M, Bloigu A, Gissler M, Heikinheimo O, et al. Trends in the incidence, rate and treatment of miscarriage-nationwide register-study in Finland, 1998-2016. Human reproduction (Oxford, England). 2019;34(11):2120-8.
359. ACOG Committee Opinion No. 760: Dysmenorrhea and Endometriosis in the Adolescent. Obstetrics and gynecology. 2018;132(6):e249-e58.

360. Shum LK, Bedaiwy MA, Allaire C, Williams C, Noga H, Albert A, et al. Deep Dyspareunia and Sexual Quality of Life in Women With Endometriosis. Sexual medicine. 2018;6(3):224-33.
361. Speer LM, Mushkbar S, Erbele T. Chronic Pelvic Pain in Women. American family physician. 2016;93(5):380-7.
362. Neis KJ, Neis F. Chronic pelvic pain: cause, diagnosis and therapy from a gynaecologist's and an endoscopist's point of view. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2009;25(11):757-61.
363. Ashrafi M, Sadatmahalleh SJ, Akhoond MR, Talebi M. Evaluation of Risk Factors Associated with Endometriosis in Infertile Women. International journal of fertility & sterility. 2016;10(1):11-21.
364. Charatsi D, Koukoura O, Ntavela IG, Chintziou F, Gkorila G, Tsagkoulis M, et al. Gastrointestinal and Urinary Tract Endometriosis: A Review on the Commonest Locations of Extrapelvic Endometriosis. Advances in medicine. 2018;2018:3461209.
365. Ranney B. Endometriosis. IV. Hereditary tendency. Obstetrics and gynecology. 1971;37(5):734-7.
366. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(5):1213-24.
367. Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. Cell Death & Differentiation. 2013;20(12):1603-14.
368. Foshay KM, Gallicano GI. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. Developmental Biology. 2009;326(2):431-43.
369. Jenike AE, Halushka MK. miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. Biomarker Research. 2021;9(1):18.
370. Gaia-Oltean AI, Braicu C, Gulei D, Ciortea R, Mihu D, Roman H, et al. Ovarian endometriosis, a precursor of ovarian cancer: Histological aspects, gene expression and microRNA alterations (Review). Exp Ther Med. 2021;21(3):243.
371. Hua R, Zhang X, Li W, Lian W, Liu Q, Gao D, et al. Ssc-miR-21-5p regulates endometrial epithelial cell proliferation, apoptosis and migration via the PDCD4/AKT pathway. Journal of cell science. 2020;133(23).
372. Duan G, Ren C, Zhang Y, Feng S. MicroRNA-26b inhibits metastasis of osteosarcoma via targeting CTGF and Smad1. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015;36(8):6201-9.
373. Liang N, Zhou X, Zhao M, Zhao D, Zhu Z, Li S-q, et al. Down-regulation of microRNA-26b modulates non-small cell lung cancer cells chemoresistance and migration through the association of PTEN. Acta biochimica et biophysica Sinica. 2015;47.
374. Absalon S, Kochanek DM, Raghavan V, Krichevsky AM. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013;33(37):14645-59.
375. Shen K, Cao Z, Zhu R, You L, Zhang T. The dual functional role of MicroRNA-18a (miR-18a) in cancer development. Clinical and Translational Medicine. 2019;8(1):32.
376. Alexandri C, Stamatopoulos B, Rothé F, Bareche Y, Devos M, Demeestere I. MicroRNA profiling and identification of let-7a as a target to prevent chemotherapy-induced primordial follicles apoptosis in mouse ovaries. Sci Rep. 2019;9(1):9636.
377. Ideozu JE, Zhang X, Rangaraj V, McColley S, Levy H. Microarray profiling identifies extracellular circulating miRNAs dysregulated in cystic fibrosis. Sci Rep. 2019;9(1):15483.
378. Tsai YS, Yeh ML, Tsai PC, Huang CI, Huang CF, Hsieh MH, et al. Clusters of Circulating let-7 Family Tumor Suppressors Are Associated with Clinical Characteristics of Chronic Hepatitis C. International journal of molecular sciences. 2020;21(14).
379. Seifer BJ, Su D, Taylor HS. Circulating miRNAs in Murine Experimental Endometriosis:Decreased Abundance of let-7a. Reproductive Sciences. 2017;24(3):376-81.
380. Yu W, Liang X, Li X, Zhang Y, Sun Z, Liu Y, et al. MicroRNA-195: a review of its role in cancers. OncoTargets and therapy. 2018;11:7109-23.

381. Dueñas A, Expósito A, Muñoz MdM, de Manuel MJ, Cámara-Morales A, Serrano-Osorio F, et al. MiR-195 enhances cardiomyogenic differentiation of the proepicardium/septum transversum by Smurf1 and Foxp1 modulation. Sci Rep. 2020;10(1):9334.
382. Wang Y, Chen H, Fu Y, Ai A, Xue S, Lyu Q, et al. MiR-195 inhibits proliferation and growth and induces apoptosis of endometrial stromal cells by targeting FKN. International journal of clinical and experimental pathology. 2013;6(12):2824-34.
383. Sagar SK. miR-106b as an emerging therapeutic target in cancer. Genes & Diseases. 2021.
384. Gorur A, Fidanci SB, Unal ND, Ayaz L, Akbayir S, Yaroglu HY, et al. Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer. Molecular biology reports. 2013;40(3):2091-6.
385. Santamaria X, Taylor H. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. Fertil Steril. 2014;101(6):1545-51.
386. Yang RQ, Teng H, Xu XH, Liu SY, Wang YH, Guo FJ, et al. Microarray analysis of microRNA deregulation and angiogenesis-related proteins in endometriosis. Genet Mol Res. 2016;15(2).
387. Wang SJ, Cao YF, Yang ZQ, Jiang ZY, Cai B, Guo J, et al. MicroRNA-93-5p increases multidrug resistance in human colorectal carcinoma cells by downregulating cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene expression. Oncology letters. 2017;13(2):722-30.
388. Chen S, Chen X, Sun KX, Xiu YL, Liu BL, Feng MX, et al. MicroRNA-93 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of Endometrial Carcinoma Cells. PloS one. 2016;11(11):e0165776.
389. Akhbari M, Biglari A, Shahrabi Farahani M, Khalili M, Bandarian F. Expression Level of Circulating miR-93 in Serum of Patients with Diabetic Nephropathy. The Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism. 2018;22:78-84.
390. Sathyapalan T, David R, Gooderham NJ, Atkin SL. Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. Sci Rep. 2015;5(1):16890.
391. Lv X, Chen P, Liu W. Down regulation of MiR-93 contributes to endometriosis through targeting MMP3 and VEGFA. American journal of cancer research. 2015;5(5):1706-17.
392. Moody L, Dvoretskiy S, An R, Mantha S, Pan YX. The Efficacy of miR-20a as a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Cancers. 2019;11(8).
393. Zhao M, Tang Q, Wu W, Xia Y, Chen D, Wang X. miR-20a contributes to endometriosis by regulating NTN4 expression. Molecular biology reports. 2014;41(9):5793-7.
394. Papari E, Noruzinia M, Kashani L, Foster WG. Identification of candidate microRNA markers of endometriosis with the use of next-generation sequencing and quantitative real-time polymerase chain reaction. Fertil Steril. 2020;113(6):1232-41.
395. Ma J, Wang W, Azhati B, Wang Y, Tusong H. miR-106a-5p Functions as a Tumor Suppressor by Targeting VEGFA in Renal Cell Carcinoma. Disease Markers. 2020;2020:8837941.
396. Li M, Zhou Y, Xia T, Zhou X, Huang Z, Zhang H, et al. Circulating microRNAs from the miR-106a-363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2018;170(2):257-70.
397. Zhou X, Chen Z, Pei L, Sun J. MicroRNA miR-106a-5p targets forkhead box transcription factor FOXC1 to suppress the cell proliferation, migration, and invasion of ectopic endometrial stromal cells via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Bioengineered. 2021;12(1):2203-13.
398. Li H, Yang Z, Gao F, Zhang Y, Meng W, Rong S. MicroRNA-17 as a potential diagnostic biomarker in pulmonary arterial hypertension. Journal of International Medical Research. 2020;48(6):0300060520920430.
399. Zhang Y, Zhang Y, Yin Y, Li S. Detection of circulating exosomal miR-17-5p serves as a novel non-invasive diagnostic marker for non-small cell lung cancer patients. Pathology - Research and Practice. 2019;215(8):152466.
400. Wang F, Wang H, Jin D, Zhang Y. Serum miR-17, IL-4, and IL-6 levels for diagnosis of endometriosis. Medicine. 2018;97(24):e10853-e.
401. Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;943:131-47.

402. Panda H, Pelakh L, Chuang TD, Luo X, Bukulmez O, Chegini N. Endometrial miR-200c is altered during transformation into cancerous states and targets the expression of ZEBs, VEGFA, FLT1, IKKβ, KLF9, and FBLN5. Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif). 2012;19(8):786-96.
403. Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. The Journal of clinical investigation. 1998;101(7):1379-84.
404. Du H, Taylor HS. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;6(1):a023002.
405. Kachgal S, Mace KA, Boudreau NJ. The dual roles of homeobox genes in vascularization and wound healing. Cell adhesion & migration. 2012;6(6):457-70.
406. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, et al. Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010;2010:369549.
407. Taghavipour M, Sadoughi F, Mirzaei H, Yousefi B, Moazzami B, Chaichian S, et al. Apoptotic functions of microRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of endometriosis. Cell & Bioscience. 2020;10(1):12.
408. Cho S, Mutlu L, Zhou Y, Taylor HS. Aromatase inhibitor regulates let-7 expression and let-7f–induced cell migration in endometrial cells from women with endometriosis. Fertility and Sterility. 2016;106(3):673-80.
409. Yan L, Zhou J, Gao Y, Ghazal S, Lu L, Bellone S, et al. Regulation of tumor cell migration and invasion by the H19/let-7 axis is antagonized by metformin-induced DNA methylation. Oncogene. 2015;34(23):3076-84.
410. Zhou W-D, Chen Q-H, Chen Q-X. [The action of p38 MAP kinase and its inhibitors on endometriosis]. Yao Xue Xue Bao. 2010;45(5):548-54.
411. Mormile R, Vittori G. MAPK signaling pathway and endometriosis: what is the link? Archives of Gynecology and Obstetrics. 2013;287(4):837-8.
412. Madanes D, Bilotas MA, Bastón JI, Singla JJ, Meresman GF, Barañao RI, et al. PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2020;36(5):436-40.
413. Koninckx PR, Ussia A, Tahlak M, Adamyan L, Wattiez A, Martin DC, et al. Infection as a potential cofactor in the genetic-epigenetic pathophysiology of endometriosis: a systematic review. Facts, views & vision in ObGyn. 2019;11(3):209-16.
414. Kinugasa S, Shinohara K, Wakatsuki A. Increased asymmetric dimethylarginine and enhanced inflammation are associated with impaired vascular reactivity in women with endometriosis. Atherosclerosis. 2011;219(2):784-8.
415. Santoro L, D'Onofrio F, Campo S, Ferraro PM, Tondi P, Campo V, et al. Endothelial dysfunction but not increased carotid intima-media thickness in young European women with endometriosis. Human Reproduction. 2012;27(5):1320-6.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:. Подпис:.

гр. София /Виктория Спасова/