

## АНОТАЦІЯ

*ПОКРОВЕНКО Д.А.* Диференційована терапія зовнішнього генітального ендометріозу з урахуванням особливостей клітинно-молекулярних маркерів. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань – 22 «Охорона здоров'я», спеціальність - 222 «Медицина». – Міністерство охорони здоров'я України, Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, 2021.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі акушерства та гінекології Дніпровського державного медичного університету за місцем роботи заочного аспіранта на період проведення дослідження ДЗ «Дніпровський обласний перинатальний центр зі стаціонаром» ДОР, «Клініка доктора Медведєва», «Медико-Хірургічний центр ім. Пирогова», репродуктивна клініка «Айвімед». Дисертація є фрагментом науково-дослідницьких робіт кафедри акушерства та гінекології Дніпровського державного медичного університету «Розробка нових підходів до діагностики, лікування та профілактики гінекологічної та акушерської патології», № держреєстрації 0118u001277, термін виконання 01.2019 – 11.2022.

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

Проблема зниження показників народжуваності та зростання проблеми непліддя в Україні та частині інших країн світу є ключовою темою для газети охорони здоров'я. Зовнішній генітальний ендометріоз - це хронічне запальне захворювання, яке характеризується наявністю тканини схожою з ендометрієм поза маткою, головним чином, на органах малого тазу та очеревині. Діагностика та лікування зовнішнього генітального ендометріозу є важливою для сучасної гінекології, адже поширеність серед жінок репродуктивного віку до 10% – це близько 176 мільйонів жінок в усьому світі, в більшості випадків ендометріоз асоціюється з тазовим болем і безпліддям.

Захворювання вражає молодих жінок та викликає безпліддя, при використанні медикаментозного лікування жінка не має можливості паралельно планувати вагітність, а хірургічні втручання впливають на оваріальний резерв, що може призводити до фатальних наслідків та необхідності застосування донації яйцеклітин. Існуючи неінвазивні методи не забезпечують достатньої ефективності на етапі ранньої діагностики, продовжується пошук доступних, точних та швидких тестів, які б допомогали скоротити часовий проміжок від першого візиту до лікаря до початку лікування та отримання очікуваного ефекту. Актуальним напрямком протягом останніх років у ранній діагностиці є вивчення епігенетичних механізмів, які відповідають за прояв певних захворювань, а саме визначення специфічних мікро-РНК в крові пацієнтів.

Враховуючи вищевказане для дисертаційної роботи було обрано сучасну тему по дослідженню неінвазивних чутливих, надійних маркерів зовнішнього генітального ендометріозу, які б допомагали в оцінці ступеню тяжкості захворювання, ранній діагностиці, вибору лікувальної тактики у жінок віком від 20 до 45 років, які є основним репродуктивним потенціалом країни.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Вперше було проведено включення такого молекулярно-генетичного маркера як мікро-РНК let-7 в комплекс обстеження жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом. Було вперше проведено наукове обґрунтування доцільності використання let-7 як біомаркера ендометріоза шляхом порівняння показників чутливості, специфічності та прогностичної цінності для СА-125 і мікро-РНК let-7 та мікро-РНК mir-9. Проведений аналіз за Манном-Уїтні показав достовірну різницю показників мікро-РНК let-7 між групами пацієток з ендометріозом і пацієток із групи контролю. При цьому інший представник мікро-РНК – mir-9 при аналогічному аналізі між групами пацієток з ендометріозом і контрольною групою, а також між групами з клінічно та гістологічно тяжким та легким ендометріозом не дав статистично значущою різниці показників ( $p > 0,05$ ). Отже, було доведено неефективність застосування mir-9.

На основі отриманих статистичних даних, а також додаткового проведення кореляційного аналізу та порівнянь груп за критеріями Манна-Уїтні було

проведено ROC-аналіз, який також продемонстрував переваги мікро-РНК let-7 (чутливість, специфічність, прогностична цінність позитивних і негативних результатів) у порівнянні з СА-125.

Враховуючи наявність наукового обґрунтування імовірної користі застосування let-7, було розроблено новий алгоритм із використанням порогу відсічки «4» для let-7 для прийняття клінічних рішень, що дозволило оптимізувати вибір тактики лікування пацієток із зовнішнім генітальним ендометріозом. В результаті перевірки запропонованого алгоритму на новій виборці вдалося продемонструвати переваги в збереженні оваріального резерва у жінок репродуктивного віку завдяки зменшенню та оптимізації методів хірургічного втручання, застосуванню сучасних підходів в галузі допоміжних репродуктивних технологій.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено алгоритм з включенням нового неінвазивного біомаркера зовнішнього генітального ендометріоза – мікроРНК let-7, який дозволяє покращити діагностику цього захворювання та обрати ефективний метод лікування на початкових стадіях, оскільки let-7 має кращі показники чутливості, специфічності, позитивних та негативних прогностичних значень ніж доступний СА-125, який також в багатьох роботах показав свої переваги над іншими біомаркерами зовнішнього генітального ендометріозу, тому був обраний нами для порівняння.

Використання запропонованого алгоритму з вимірюванням let-7 у сироватці крові дозволило знизити час до лікування ендометріоза за рахунок більшої чутливості та, одночасно специфічності. Використання алгоритму дозволяє знизити ризики зменшення оваріального резерва за рахунок зниження частоти використання хірургічних методів.

Результати дисертаційної роботи впроваджено в клінічну практику, перевірку ефективності запропонованого алгоритму лікування проведено на базі Медичного центру «Клініка доктора Медведєва» м. Дніпро, «Хірургічний центр імені Пирогова» м. Дніпро, репродуктивного центру «Родинне Джерело» м. Київ.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано наукових праць, з них: –2 статті в наукових фахових виданнях України, 4 – статті в журналах, що

входять до міжнародних наукометричних баз (Scopus, Web of Science), 10 – матеріали конгресів та наукових конференцій.

**Ключові слова:** зовнішній генітальний ендометріоз, алгоритм лікування ендометріозу, мікро-РНК let-7, мікро-РНК mir-9, ПЛР в реальному часі, раковий антиген СА-125.

## ANNOTATION

*POKROVENKO D.A.* Differentiated therapy of external genital endometriosis taking into account the features of cell-molecular markers. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty - 222 "Medicine" (specialization - obstetrics and gynecology). Dnipro State Medical University, Dnipro, 2021.

The dissertation was performed in the Department of Obstetrics and Gynecology of Dnipro State Medical University at the place of work of a part-time graduate student for the period of research SI "Dnipro Regional Perinatal Center with Hospital", Reproductive clinic "IVMED". The dissertation is a fragment of research work of the Department of Obstetrics and Gynecology of Dnipro State Medical University "Development of new approaches to diagnosis, treatment and prevention of gynecological and obstetric pathology", № state registration 0118u001277, terms of performing 01.2019 - 11.2022.

The issue of birth rates and the growth of infertility in Ukraine and parts of the world is a key issue for the health care industry. External genital endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by the presence of endometrial-like tissue outside the uterus, mainly on the pelvic organs and peritoneum. Diagnosis and treatment of external genital endometriosis is important for modern gynecology and reproductive medicine, as the prevalence among women of childbearing age up to 10% is about 176 million women worldwide, in most cases endometriosis is associated with pelvic pain and infertility.

The disease affects young women and causes subfertility and infertility, when using medical treatment a woman is not able to plan a pregnancy in parallel, and surgery affects the ovarian reserve, which can lead to fatal consequences and the need

for egg donation. Existing non-invasive methods do not provide sufficient effectiveness at the stage of early diagnosis, continues to search for available rapid tests that help reduce the time between the first visit to the doctor before treatment and the expected effect. An important area of recent years in early diagnosis is the study of epigenetic diseases that differ in the manifestations of the disease, namely the identification of specific micro-RNA in a particular mechanism.

Given the above, the dissertation selected a modern topic for the establishment of non-invasive sensitive, reliable markers of external genital endometriosis, which would help assess the severity of the disease, early diagnosis, choice of treatment tactics for women aged 20 to 45, which are the main potential of the country.

**The novelty of the study and the results.** For the first time the molecular genetic marker such as let-7 miRNA was included in the complex of examination of women with external genital endometriosis and a new algorithm was used to select the optimal treatment tactics for patients with this pathology. The proposed algorithm of diagnosis and treatment allowed to preserve the ovarian reserve in women of reproductive age by reducing and optimizing the methods of surgery, the use of modern approaches in the field of assisted reproductive technologies.

For the first time, the comparison of sensitivity, specificity and prognostic value was performed for such non-invasive biomarkers in the blood of patients with EGE as CA-125 and let-7 miRNA and mir-9 miRNA. Mann-Whitney analysis showed a significant difference in let-7 miRNA levels between groups of patients with endometriosis and patients in the control group. At the same time, another representative biomarker miRNA mir-9 in a similar analysis between groups of patients with endometriosis and the control group, as well as between groups with clinically and histologically severe and mild endometriosis did not give a statistically significant difference.

Given into account that the cancer antigen CA-125 is used to diagnose endometriosis ovarian cysts, we performed the analysis of sensitivity, specificity, positive and negative prognostic values. Based on promising data obtained from correlation analysis and groups comparisons using Mann-Witney criteria, we decided to perform the ROC analysis. The following indicators has been calculated in our ROC

analysis of miRNA let-7 and also for CA-125. For miRNA let-7 sensitivity was 92.563, specificity - 82.545, PPV - 93.912, NPV - 79.234. Indicators of the classification model for CA-125 were: sensitivity - 86.105, specificity - 76.422, PPV - 91.397, NPV - 65.406. We've seen from the ROC analysis that flat under curve for miRNA let-7 is higher than for CA-125. Thus, miRNA let-7 has the best parameters (sensitivity, specificity, predictive value of positive and negative results). Comparison with Ca-125 using ROC analysis showed the presence of the larger area under the curve, it indicates great prospects for this marker, which may be used for early diagnosis of endometriosis.

**The practical significance of the results.** The developed algorithm with the inclusion of a new non-invasive biomarker allows to improve the diagnosis of this disease and choose an effective method of treatment in the early stages of the disease, let-7 miRNA has better sensitivity, specificity, positive and negative prognostic values showed its advantages over other EGE biomarkers, so it was chosen by us for comparison. The median value of let-7 miRNA was 4.43, when analyzing the mean values of the indicator and comparing endometriosis group 1 (mild and moderate) and endometriosis group 2 (moderate and severe endometriosis), we obtained an average value of 3.96 in the latter group, thus the indicator let-7 "4" was chosen for use in the new algorithm.

To test the effectiveness of the algorithm, a study was conducted on 32 women with PGI, treatment tactics were determined taking into account the indicator of a new biomarker (group 3, n = 32). Results compared with the group of patients with EGE in the main part of the study, all women from whom underwent laparoscopic treatment without taking into account the indicators of let-7 miRNA in the blood (group 1 + 2, n = 64). We determined the significance of the difference between the studied groups using t-test (Student's criteria). This allowed us to make the correct distribution of data in the study groups. The study of the distribution was carried out by the Shapiro-Wilk method. According to the results of p-value calculation for comparison groups on such indicators as VAS, AMH, AFC, Age, BMI, Ca-125 level (IU / ml), the level of miRNA let-7 – groups wasn't statistically different. A statistically significant difference between these groups was found in the indicator "Time to treatment" (p = 0.001). After that, the results of treatment in both groups were evaluated. In group 1 + 2, due to the

fact that all patients had the surgical treatment, we noted a decrease in ovarian reserve -AMH and AFC in 1.8 times, which is a negative fact, and indicators of the intensity of pain (VAS scores) were significantly reduced, which can be assessed as a positive effect of treatment. To comparing the results before and after treatment in the test group of the algorithm there was no difference in ovarian reserve due to reduced frequency of surgical treatment, use of modified sclerotherapy techniques and ART methods, while the effect of treatment as a significant difference in pain intensity was achieved. This once again proves the need for a differentiated approach to the selection of treatment for external genital endometriosis, taking into account additional non-invasive biomarkers.

The results of the dissertation were introduced into clinical practice, the effectiveness of the proposed treatment algorithm was tested on the basis of the Medical Center "Dr. Medvedev Clinic" in Dnipro, "Surgical Center named after Pirogov" in Dnipro, reproductive center "Family Source" in Kyiv.

**Publications.** According to the results of the dissertation 10 scientific works were published, including: - 2 articles in scientific journals of Ukraine, 4 - articles in journals included in international scientometric databases (Scopus, Web of Science), 10 - materials of congresses and scientific conferences.

**Key words:** external genital endometriosis, endometriosis treatment algorithm, microRNA let-7, microRNA mir-9, real-time PCR, cancer antigen CA-125.

### **Список робіт здобувача за темою дисертації**

1. Medvediev M, Pokrovenko D. Modern view on the etiology, pathogenesis and possibilities of diagnostics of external genital endometriosis. *Med Perspekt.* 2019;24(1):21-30. (Scopus; особистий внесок – провела огляд іноземної літератури на вказану тему, підготувала публікацію до направлення в журнал).
2. Pokrovenko DA, Vozniuk V, Medvediev MV. MicroRNA let-7: a promising non-invasive biomarker for diagnosing and treating external genital endometriosis. *Turk J Obstet Gynecol.* 2021;18(4):291-297. DOI: 10.4274/tjod.galenos.2021.07277. (Web of Science; провела аналіз

результатів проспективної частини дослідження, підготувала основну частину тексту статті).

3. Medvediev M, Spesyvtsev D, Pokrovenko D. A case of neovagina surgical creation using the uterine cervix remnant in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Fertil Steril.* 2021;116(5):1420-1422. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.06.030. (Scopus+Web of Science; Відео-публікація кейсу пацієнтки із зовнішнім генітальним ендометріозом та аномалією Майєра-Рокітанського- Кюстнера- Хауса, особистий внесок – огляд літератури за темою, участь в операції)
4. Laganà S, Garzon S, Dababou S, Uccella S, Medvediev M, Pokrovenko D. [et al.] Prevalence of intrauterine adhesions after myomectomy: a prospective multicenter observational study. *J Gynecol Obstet Invest.* 2022. (Офіційний журнал FIGO, приймала участь у підготовці даних для мультицентрового дослідження)
5. Покровенко ДА, Медведєв МВ. Ефективність медикаментозної терапії у комплексному лікуванні ендометріозу: ретроспективний аналіз даних. В: Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2019;2(44):104-110. (Особистий внесок – планування дослідження, збір та аналіз результатів, підготовка статті до направлення в журнал)
6. Покровенко ДА, Медведєв МВ. Алгоритм лікування зовнішнього генітального ендометріозу із застосуванням нових молекулярних маркерів. *Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології.* 2021;2:27-34. DOI: 10.11603/24116-4944.2021.2.12607. (Особистий внесок – провела планування дослідження, збір та аналіз результатів, підготовку статті до направлення в журнал)
7. Покровенко ДА, Медведєв МВ. Диференційована терапія зовнішнього генітального ендометріозу з урахуванням особливостей клітинно-молекулярних маркерів. В: Збірник наукових робіт IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія і практика сучасної морфології». 4-6 Лис 2020; Дніпро; Україна. Дніпро: ДЗ "Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я



- України"; 2020. Р. 88-92. (Особистий внесок – планування дослідження, збір та аналіз результатів, підготовка статті до направлення в журнал та презентації для виступу на конференції)
8. Medvediev M, Pokrovenko D. External genital endometriosis diagnosis: do new genetic features matter? In: Oral Communication Global Congress on Hysteroscopy. May 2019. (Особистий внесок – планування дослідження, збір та аналіз первинних результатів, підготовка презентації)
  9. Покровенко ДА, Медведєв МВ. «Діагноз зовнішнього генітального ендометріозу: чи мають значення молекулярні ознаки?». Постерна доповідь. В: Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання репродуктивної медицини в Україні». Дніпро; 28-29 Бер 2019. (Особистий внесок -підготовка постерної доповіді)
  10. Pokrovenko D. Plasma microRNA level as a non-invasive predictor in assessing the degree of genital endometriosis lesion. In: Video-presentation on 3th IVF Worldwide Congress in Reproductive Medicine. 2-3 Apr 2021. (Особистий внесок – планування дослідження, збір та аналіз результатів, відео-презентація на конгресі та постерна доповідь)
  11. Pokrovenko D, Medvediev M. Promising non-invasive biomarker for diagnosis and treating external genital endometriosis. In: Poster Presentation Global Congress on Hysteroscopy. May 2021. (Особистий внесок – планування дослідження, збір та аналіз результатів, відео-презентація на конгресі та постерна доповідь)
  12. Покровенко ДА, Медведєв МВ. «Ефективність медикаментозної терапії у комплексному лікуванні ендометріозу: ретроспективний аналіз даних». Постерна доповідь. В: Науково-практична on-line конференція «Актуальні питання репродуктивного здоров'я в Україні». Дніпро; 8-9 Квіт 2021. (Особистий внесок -підготовка постерної доповіді)
  13. Pokrovenko D. Level of micro-RNA let-7 and mir-9 in plasma as a non-invasive predictor in assessing the degree of genital endometriosis lesion. In: Poster presentation «Endometriosis 2021. The world is on air». May 2021. (Особистий

внесок – планування дослідження, збір та аналіз результатів, постерна доповідь та участь в онлайн-обговоренні на секції конгресу)

14. Покровенко ДА. «Ендометріоз у 10 кейсах» участь із доповіддю на онлайн курсі; КДМ; Дніпро; 2021. (Особистий внесок -підготовка доповіді та онлайн виступ).
15. Покровенко ДА. «Аденоміоз: оперувати чи ні?» Виступ на профі-лаб «Репродуктологія» 17.12.2021. (Особистий внесок -підготовка доповіді та онлайн виступ).
16. Pokrovenko D. New algorithm for choosing treatment tactics for patients with external genital endometriosis including miRNA let-7. IN: Endometriosis Online Congress; 21-22 Jan 2022. Oral presentation (Підготувала доповідь та онлайн-презентацію результатів по використанню нового алгоритму лікувальної тактики).