

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Буковинський державний медичний університет

Тернопільський національний медичний університет

імені І.Я Горбачевського МОЗ України

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

**Барбе Адріан Михайлович**

УДК 618.14-002-007.62-007.415-02-07-08-092

**Дисертація**

**НОВІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ РАННІХ СТАДІЙ**

**ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ**

**ТА СВОЄЧАСНОГО ЛІКУВАННЯ**

22 «Охорона здоров'я»

222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне

джерело \_\_\_\_\_ А.М. Барбе

Науковий керівник: Юзько Олександр Михайлович, заслужений лікар України, доктор медичних наук, професор

Чернівці – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Барбе А.М.* Нові підходи до діагностики ранніх стадій перитонеального ендометріозу та своєчасного лікування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Буковинський державний медичний університет, Чернівці, 2021.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2021.

У дисертаційній роботі, використовуючи експериментальну модель ендометріозу на щурах, встановлено нові підходи для лікування ендометріозу та визначення їх ефективності. В даній роботі, на основі клінічних даних, встановлено нові можливості діагностики ранніх клінічних стадій перитонеального ендометріозу використовуючи сучасні патогенетичні уявлення та статистичне моделювання.

Дослідження включало експериментальну та клінічну частини роботи.

Робота виконана на 83 дорослих статевозрілих самок білих щурів (експериментальна частина) та на 43 жінках репродуктивного віку (клінічна частина).

Як в експериментальній, так і в клінічній частині дослідження проводили морфологічну та морфометричну оцінку отриманих зразків, а також імуногістохімічне дослідження (MMP-2, MMP-9, VEGFR-2) та об'єктивізацію отриманих даних. Для цього використовували програмне забезпечення ImageJ 1.48 та застосунок ІНС Profiler.

При статистичній оцінці перевіряли нормальність розподілу параметрів у вибірках за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова або Shapiro-Wilk. Достовірність різниці між незалежними вибірками тестували за допомогою t-критерію Student або U-критерію Wilcoxon-Mann-Whitney. Біваріантну

кореляцію визначали за допомогою кореляції Пірсона. До отриманих клініко-лабораторних та гістологічних результатів застосували алгоритм логістичної регресії за методом “Enter”.

При проведенні експериментальної частини досліджень усім піддослідним тваринам було проведено оперативне втручання з метою індукції експериментального ендометріозу (патент України на корисну модель №141838 «Спосіб індукції експериментального ендометріозу у щурів»). Усім тваринам проводилося естрогенна підтримка експериментальної моделі ендометріозу шляхом введення естрадіолу валерату у дозі 0,03 мг/кг маси тіла. Згодом усі тварини були поділені на 4 групи випадковим чином. У першій дослідній групі (21 щур) був застосований агоніст дофамінових рецепторів у дозі 0,075 мг/кг. У другій дослідній групі (19 щурів) – агоніст дофамінових рецепторів у дозі 0,075 мг/кг маси тіла та високоселективний інгібітор ЦОГ-2 у дозі 30 мг/кг маси тіла. У третій дослідній групі (20 щурів) – високоселективний інгібітор ЦОГ-2 у дозі 30 мг/кг маси тіла. Четвертій, контрольній групі тварин (20 щурів) – вводили фізіологічний розчин. На 26-ий день дослідження було виконано евтаназію з використанням знечулення тіопенталом 5-7 мг/кг маси тіла та забір ендометріюїдних гетеротопій.

При проведенні макроскопічних досліджень у експериментальній групі визначили, що об'єм уражень при застосуванні агоністу дофамінових рецепторів у 8,9 разів менший, аніж у групі контролю (27,27 проти 243,88 мм<sup>3</sup>,  $p < 0,0001$ ). Проте, при застосуванні комбінації агоніст дофамінових рецепторів + високоселективний інгібітор ЦОГ-2 об'єм уражень був в 3.5 разів менший порівняно з контролем (71,1 проти 243,88 мм<sup>3</sup>,  $p < 0,0001$ ). При морфометрії мікропрепаратів визначили, що висота секреторних епітеліоцитів ендометріюїдних уражень достовірно була меншою лише у випадку застосування агоністу дофамінових рецепторів (18,06 мкм проти 28,39,  $p < 0,0001$ ); у інших групах – недостовірно відрізнялася. При проведенні об'єктивізації даних імуногістохімічного дослідження за допомогою

програмного забезпечення ImageJ разом з ІНС Profiler отримали наступні результати. У групі, де застосували агоніст дофамінових рецепторів, визначили достовірно менші значення оптичної густини ІГХ MMP-2 –  $1,7158 \pm 0,27$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,0003$ ). Схожі результати отримали при визначенні експресії MMP-9 –  $1,8763 \pm 0,20$  проти  $2,1850 \pm 0,3145$  ( $p = 0,0013$ ). При визначенні експресії VEGFR-2 у контрольній групі при експериментальному ендометріозі нами були виявлені групи позитивно зафарбованих клітин з певною закономірністю – вони розташувалися в товщі стінок капілярів, в капілярному просторі або в міжклітинному просторі в місцях ймовірного ангіонеогенезу. Натомість, у всіх дослідних групах при використанні CBG спостерігали переважно повну відсутність позитивних VEGFR-2 клітин. У другій та третій дослідних групах результати підтверджують виявлені морфометричні тенденції – експресія MMP-2 та MMP-9 є нижчою, аніж у контрольній групі, проте менш виражено, аніж при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів (агоніст дофамінових рецепторів та високоселективний інгібітор ЦОГ-2: MMP-2 –  $1,617 \pm 0,18$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,0001$ ), MMP-9 –  $1,595 \pm 0,23$  проти  $2,185 \pm 0,3145$  ( $p = 0,0001$ ); високоселективний інгібітор ЦОГ-2: MMP-2 –  $2,29 \pm 0,18$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,06$ ), MMP-9 –  $2,487 \pm 0,26$  проти  $2,185 \pm 0,145$  ( $p = 0,03$ )). Таким чином, застосування агоніста дофамінових рецепторів показало найбільш виражену інгібуючу дію на гетеротопії при експериментальному ендометріозі; в той же час застосування агоніста дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітора ЦОГ-2 або високоселективного інгібітора ЦОГ-2 окремо не дає бажаного зниження морфометричних показників та показників експресії MMP-2 та MMP-9.

При проведенні клінічної частини досліджень було залучено 43 жінки віком 22-40 років та були поділені на 2 групи: дослідна ( $n=31$ ) та контрольна ( $n=12$ ). За віком, кількістю вагітностей, пологів, мимовільних викиднів групи достовірно не відрізнялися. При вивченні показників загального аналізу крові та біохімічного аналізу крові – відмінностей між групами також не знайдено.

Проте, при порівнянні рівнів онкомаркерів СА-125 (59,55 Од/мл проти 11,78 Од/мл,  $p < 0,003$ ) та HE4 (51,21 пмоль/л проти 24,36 пмоль/л,  $p < 0,003$ ) виявлено достовірну різницю. Саме тому, нами були залучені дані показники при побудові регресійної моделі.

При проведенні імуногістохімічних досліджень нами отримані наступні дані. При порівнянні експресії MMP-2 у еутопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявили, що експресія у дослідній групі достовірна вища, ніж у контрольній групі ( $1,77 \pm 0,22$  проти  $1,41 \pm 0,34$ ,  $p = 0,001$ ). При порівнянні експресії MMP-2 у ектопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявили достовірну різницю у експресії на користь дослідної групи ( $1,82 \pm 0,27$  проти  $1,41 \pm 0,34$ ,  $p = 0,001$ ). Натомість, при порівнянні експресії між ектопічним та еутопічним ендометрієм дослідної групи достовірної різниці не знайдено ( $p = 0,44$ ). Виявлена сильна кореляція між еутопічним та ектопічним ендометрієм у дослідній групі ( $r = 0,740$  при  $p < 0,001$ ), що може підтвердити ендометріальне походження MMP-2 при зовнішньому генітальному ендометріозі. При порівнянні експресії MMP-9 у ектопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявили достовірну різницю у експресії на користь дослідної групи ( $1,87 \pm 0,05$  проти  $1,35 \pm 0,02$ ,  $p = 0,001$ ). Натомість, при порівнянні експресії між ектопічним та еутопічним ендометрієм дослідної групи достовірної різниці не знайдено ( $p = 0,81$ ). Для експресії MMP-9 виявлена сильна кореляція між еутопічним та ектопічним ендометрієм у дослідній групі ( $r = 0,887$  при  $p < 0,001$ ). Визначення експресії VEGFR-2 виявило достовірну різницю між ектопічним та еутопічним ендометрієм дослідної групи ( $5,64 \pm 0,79$  клітини проти  $0,19 \pm 0,07$  клітини при  $p < 0,001$ ), проте не виявлено достовірної різниці між еутопічним ендометрієм дослідної та контрольної груп. Отримані нами дані підтверджують гіпотезу про перитонеальне походження (макрофаги та дендритні клітини) VEGF-A.

На основі отриманих нами клініко-лабораторних та імуногістохімічних даних ми оцінили ймовірний вплив кожного фактора, який детермінує наявність або відсутність ендометріозу. Для цього ми застосували логістичну регресію – статистичну модель, яка використовується для прогнозування вірогідності виникнення тієї чи іншої події шляхом її порівняння з логістичною кривою. У розрахованій регресійній моделі немає окремого детермінуючого параметра ( $p$  дорівнює більше 0,05 у всіх випадках), проте домінуючими параметрами, які прямо пропорційно впливають на вірогідність наявності ендометріозу є підвищений рівень СА-125, підвищена експресія MMP-2 та, зокрема, підвищена експресія MMP-9. На основі даних показників було побудовано ROC-криву за методикою DeLong et al. (1988). В результаті розрахунків отримали площу під ROC-кривою (AUROC)  $> 0,9$ , чутливість – 92,77%, специфічність – 90,67. Отримані в дослідженні значення чутливості та специфічності дозволяють використовувати запропоновану регресійну модель, як основу для комплексного діагностичного критерію ранньої діагностики ендометріозу

*Наукова новизна одержаних результатів.*

Суттєво доповнені уявлення про патогенез ендометріозу за рахунок вивчення в експерименті ролі VEGF, MMP-2 та MMP-9.

Вперше була випробувана патогенетично обґрунтована комбінація агоніста дофамінових рецепторів (у ролі інгібітора ангіонеогенезу) та ЦОГ-2 на експериментальній моделі ендометріозу.

Вперше встановлено активність матричних металопротеїназ (MMP) 2 та 9 одночасно в ектопічних ендометріюїдних вогнищах та в еутопічному ендометрії у пацієнтів з ендометріозом.

Вперше, за допомогою імуногістохімії, встановлено кореляційний зв'язок між активністю матричних металопротеїназ 2 та 9 в ектопічних ендометріюїдних вогнищах та в еутопічному ендометрії.

Вперше запропоновано та випробувано дію агоніста дофамінових рецепторів у якості інгібітора судинного фактору росту судин (VEGF) при експериментальному ендометріозі.

*Практичне значення одержаних результатів.* Проведені дослідження дозволили розробити регресійну модель на основі багатофакторного аналізу, яка здатна покращити ефективність малоінвазивної діагностики ранніх стадій ендометріозу; вивчено та апробовано на експериментальній моделі (на лабораторних щурах) нові підходи до лікування ендометріозу.

Результати дисертаційного дослідження впроваджено в лікувальну практику КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», а також впроваджено в навчальному процесі на кафедрах акушерства та гінекології та кафедрі патофізіології Буковинського державного медичного університету, що підтверджено відповідними актами впровадження.

*Ключові слова:* експериментальний ендометріоз, зовнішній генітальний ендометріоз, MMP-2, MMP-9, VEGF, VEGFR-2, агоністи дофаміну, інгібітори ЦОГ-2, регресійна модель.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

*Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:*

1. Барбе АМ, Бербець АМ, Давиденко ІС, Юзько ОМ. Експериментальна модель ендометріозу на щурах. Клінічна та експериментальна патологія. 2019;18(3):3-9. doi: <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XVIII.3.69.2019.1>
2. Барбе АМ, Бербець АМ, Юзько ОМ. Особливості експериментального ендометріозу при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;2:75-82. doi: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2019.v0.i2.10372>
3. Барбе АМ, Бербець АМ, Барбе КМ, Юзько ОМ. Сучасні погляди на патогенез екстрагенітального ендометріозу (Огляд літератури). Здобутки

doi: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2019.v.i3.10494>

4. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Yuzko V, Yuzko O. The effects of certain angiogenesis inhibitors in experimental endometriosis in rats. Cell and Organ Transplantology. 2019;7(2):140-7. (SCOPUS) doi: [10.22494/cot.v7i2.101](https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.101)

5. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Koval H, Yuzko V, Yuzko O. Expression and significance of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in endometriosis. Journal of Medicine and Life. 2020;13(3):314-20. (SCOPUS) doi: [10.25122/jml-2020-0117](https://doi.org/10.25122/jml-2020-0117)

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

6. Барбе АМ, Волкова ДЕ. Експериментальна модель ендометріозу на самках білих статевозрілих щурів. Хист. 2016;18:12.

7. Барбе АМ. Сучасні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу. В: Рожко ММ, редактор. Матеріали 85-ї наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених із міжнар. участю Інновації в медицині; 2016 Бер 24-25; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2016, с. 215-6.

8. Барбе АМ. Гомологічні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу на гризунах. В: Смоланка ВВ, укладач. Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. студентської конференції Науковий потенціал молоді – прогрес медицини майбутнього; 2016 Кві 20-23; Ужгород. Ужгород: Говерла; 2016, с. 195-6.

9. Барбе АМ. Патофізіологічні процеси та імунна дисфункція при ендометріозі. В: Матеріали XIII міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Актуальні питання сучасної медицини; 2016 Кві 14-16; Харків. Харків; 2016, с. 71-2.

10. Барбе А. Роль вазоендотеліального фактору росту судин (VEGF) при ендометріозі. В: Корда ММ, редактор. Матеріали XX міжнар. медичного



конгресу студентів та молодих вчених; 2016 Кві 25-27; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2016, с. 198.

11. Барбе АМ, Бербець АМ, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», патентовласник. Спосіб індукції експериментального ендометріозу у щурів. Патент України № 141838. 2020 Кві 27.

## ANNOTATION

*Barbe A.M.* Current Approaches to Diagnose Early Stages of Peritoneal Endometriosis and Timely Treatment. – Qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for the degree of the Doctor of Philosophy (PhD) on a specialty 222 “Medicine” (22 Health care) – Bukovinian State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, 2021.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2021.

In the dissertation, using an experimental model of endometriosis in rats, new approaches for the treatment of endometriosis and determining their effectiveness were established. In this work, based on clinical data, new possibilities for diagnosing the early clinical stages of peritoneal endometriosis using modern pathogenetic representations and statistical modeling have been identified.

The study included experimental and clinical parts.

The work was performed on 83 adult female white rats (experimental part) and 43 women of reproductive age (clinical part).

In both the experimental and clinical parts of the study, morphological and morphometric evaluation of the obtained samples, as well as immunohistochemical study (MMP-2, MMP-9, VEGFR-2) and objectification of the obtained data were performed. ImageJ 1.48 software and IHC Profiler application were used for this purpose.

In the statistical evaluation, the normality of the distribution of parameters in the samples was checked using the Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk test. The significance of the difference between the independent samples was tested using the Student's t-test or the Wilcoxon-Mann-Whitney U-test. Bivariate correlation was determined using Pearson's correlation. The logistic regression algorithm by the "Enter" method was applied to the obtained clinical-laboratory and histological results.

During the experimental part of the study, all experimental animals underwent surgery to induce experimental endometriosis (Ukrainian patent for utility model №141838 "Method of induction of experimental endometriosis in rats"). All animals underwent estrogenic support in an experimental model of endometriosis by administering estradiol valerate at a dose of 0.03 mg/kg body weight. Subsequently, all animals were divided into 4 groups at random. In the first experimental group (21 rats), the dopamine receptor agonist cabergoline (ATX: G02CB03) was used at a dose of 0.075 mg/kg. In the second experimental group (19 rats), a dopamine receptor agonist (cabergoline) at a dose of 0.075 mg/kg body weight and a COX-2 inhibitor (celecoxib) (ATX: L01XX33, M01AH01) at a dose of 30 mg/kg body weight were used. In the third experimental group (20 rats) – COX-2 inhibitor (celecoxib) at a dose of 30 mg / kg body weight. The fourth, control group of animals (20 rats) - was injected with saline. On the 26th day of the experiment, euthanasia was performed using thiopental anesthesia 5-7 mg/kg body weight and endometrioid heterotopias were collected.

In the experimental group, macroscopic studies showed that the amount of lesions with the use of cabergoline was 8.9 times smaller than in the control group (27.27 vs. 243.88 mm<sup>3</sup>,  $p < 0.0001$ ). However, when the combination of cabergoline + celecoxib was used, the volume of lesions was 3.5 times smaller compared to the control (71.1 vs. 243.88 mm<sup>3</sup>,  $p < 0.0001$ ). When performing morphometry of histological micropreparations, it was determined that the height of secretory epitheliocytes of endometrioid lesions was significantly lower only in the case of

cabergoline (18.06  $\mu\text{m}$  vs. 28.39,  $p < 0.0001$ ); in other groups - statistically insignificantly different. The following results were obtained when objectifying the immunohistochemical study data using ImageJ software together with IHC Profiler. In the group where cabergoline was used, significantly lower values of the optical density of IGC MMP-2 were determined -  $1.7158 \pm 0.27$  vs.  $2.08 \pm 0.31$  ( $p = 0.0003$ ). Similar results were obtained when determining the expression of MMP-9 -  $1,8763 \pm 0.20$  against  $2,1850 \pm 0.3145$  ( $p = 0,0013$ ). When determining the expression of VEGFR-2 in the control group in experimental endometriosis, we found groups of positively stained cells with a certain pattern - they are located in the thickness of the capillary walls, in the capillary space or in the intercellular space in places of probable angiogenesis. In contrast, in all experimental groups, the complete absence of VEGFR-2 positive cells was observed with the use of cabergoline. In the second and third experimental groups, the results confirm the detected morphometric trends - the expression of MMP-2 and MMP-9 is lower than in the control group, but less pronounced than with cabergoline (cabergoline and celecoxib: MMP-2 -  $1.617 \pm 0.18$  against  $2.08 \pm 0.31$  ( $p = 0.0001$ ), MMP-9 -  $1.595 \pm 0.23$  against  $2.185 \pm 0.3145$  ( $p = 0.0001$ ), celecoxib: MMP-2 -  $2.29 \pm 0.18$  against  $2.08 \pm 0.31 = 0.06$ ), MMP-9 -  $2.487 \pm 0.26$  vs.  $2.185 \pm 0.3145$  ( $p = 0.03$ )). Thus, the use of cabergoline showed the most pronounced inhibitory effect on heterotopia in experimental endometriosis; at the same time, the use of cabergoline and celecoxib or celecoxib alone does not give the desired reduction in morphometric and expression parameters of MMP-2 and MMP-9.

During the clinical part of the study, 43 women aged 22-40 years were involved and were divided into 2 groups: experimental ( $n = 31$ ) and control ( $n = 12$ ). By age, number of pregnancies, births, miscarriages, the group did not differ significantly. When studying the indicators of general blood tests and biochemical blood tests - no differences between groups were found. However, when comparing the levels of tumor markers CA-125 (59.55 U/ml vs. 11.78 U/ml,  $p < 0.003$ ) and HE4 (51.21 pmol/l vs. 24.36 pmol/l,  $p < 0.003$ ) revealed significant difference. That is

why we used these indicators when building a regression model. When performing immunohistochemical studies, we obtained the following data. When comparing the expression of MMP-2 in the eutopic endometrium in the experimental group and in the eutopic endometrium of the control group, it was found that the expression in the experimental group was significantly higher than in the control group ( $1.77 \pm 0.22$  vs.  $1.41 \pm 0.34$ ,  $p = 0.001$ ). When comparing the expression of MMP-2 in the ectopic endometrium in the experimental group and in the eutopic endometrium of the control group, we found a significant difference in expression in favor of the experimental group ( $1.82 \pm 0.27$  vs.  $1.41 \pm 0.34$ ,  $p = 0.001$ ). Instead, when comparing the expression between the ectopic and eutopic endometrium of the experimental group, no significant difference was found ( $p = 0.44$ ). There was a strong correlation between eutopic and ectopic endometrium in the experimental group ( $r = 0.740$  at  $p < 0.001$ ), which may confirm the endometrial origin of MMP-2 in external genital endometriosis. When comparing the expression of MMP-9 in the ectopic endometrium in the experimental group and in the eutopic endometrium of the control group found a significant difference in expression in favor of the experimental group ( $1.87 \pm 0.05$  vs.  $1.35 \pm 0.02$ ,  $p = 0.001$ ). Instead, when comparing the expression between the ectopic and eutopic endometrium of the experimental group, no significant difference was found ( $p = 0.81$ ). For MMP-9 expression, a strong correlation was found between eutopic and ectopic endometrium in the experimental group ( $r = 0.887$  at  $p < 0.001$ ). Determination of VEGFR-2 expression revealed a significant difference between the ectopic and eutopic endometrium of the experimental group ( $5.64 \pm 0.79$  cells versus  $0.19 \pm 0.07$  cells at  $p < 0.001$ ), but no significant difference was found between the eutopic endometrium of the experimental and control groups. Our data support the hypothesis of peritoneal origin (macrophages and dendritic cells) of VEGF-A.

Based on our clinical, laboratory and immunohistochemical data, we assessed the probable influence of each factor that determines the presence or absence of endometriosis. To do this, we used logistic regression – a statistical model used to

predict the probability of an event by comparing it with the logistics curve. In the calculated regression model, there is no separate determining parameter ( $p$  is more than 0.05 in all cases), but the dominant parameters that directly proportionally affect the probability of endometriosis are elevated levels of CA-125, increased expression of MMP-2 and, in particular, increased expression MMP-9. Based on these indicators, an ROC curve was constructed according to the method of DeLong et al. (1988). As a result of calculations, we obtained the area under the ROC-curve (AUROC)  $> 0.9$ , sensitivity – 92.77 %, specificity – 90.67. The values of sensitivity and specificity obtained in the study allow to use the proposed regression model as a basis for a comprehensive diagnostic criterion for early diagnosis of endometriosis.

*Scientific novelty of the obtained results.*

The ideas about the pathogenesis of endometriosis have been significantly supplemented by studying the role of VEGF, MMP-2 and MMP-9 in the experiment.

For the first time, a pathogenetically substantiated combination of a dopamine receptor agonist (as an inhibitor of angiogenesis) and COX-2 was tested in an experimental model of endometriosis.

For the first time, the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 was established simultaneously in ectopic endometrioid foci and in eutopic endometrium in patients with endometriosis.

For the first time, with the help of immunohistochemistry, a correlation was established between the activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ectopic endometrioid foci and in eutopic endometrium.

The action of a dopamine receptor agonist as a vascular growth factor inhibitor (VEGF) in experimental endometriosis was first proposed and tested.

*The practical significance of the obtained results.* The conducted research allowed to develop a regression model based on multifactor analysis, which can improve the efficiency of minimally invasive diagnosis of early stages of endometriosis; new approaches to the treatment of endometriosis were studied and tested in an experimental model (on laboratory rats).

The results of the dissertation research were introduced into the medical practice of CHCI "Medical Center for Infertility Treatment", as well as introduced in the educational process at the Departments of Obstetrics and Gynecology and the Department of Pathophysiology of Bukovina State Medical University, which is confirmed by relevant implementing acts.

*Keywords:* experimental endometriosis, external genital endometriosis, MMP-2, MMP-9, VEGF, VEGFR-2, dopamine agonists, COX-2 inhibitors, regression model.

## ЗМІСТ

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Перелік умовних скорочень .....                                                                       | 18 |
| Вступ .....                                                                                           | 19 |
| РОЗДІЛ 1 Генітальний ендометріоз – сучасний стан проблеми (огляд літератури) .....                    | 26 |
| 1.1 Зовнішній генітальний ендометріоз: сучасний стан проблеми, теорії генезу .....                    | 26 |
| 1.2 Методи консервативної терапії перитонеального ендометріозу.....                                   | 39 |
| 1.3 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз. Способи індукції у лабораторних тварин ..... | 41 |
| 1.4 Блокування ангіонеогенезу, як можливий метод лікування перитонеального ендометріозу .....         | 54 |
| РОЗДІЛ 2 Матеріал та методи дослідження .....                                                         | 61 |
| 2.1 Характеристика експериментальних досліджуваних груп.....                                          | 62 |
| 2.2 Характеристика груп обстежених жінок із зовнішнім генітальним ендометріозом .....                 | 64 |
| 2.3 Методи дослідження .....                                                                          | 66 |
| 2.3.1 Моделювання перитонеального ендометріозу у щурів.....                                           | 66 |
| 2.3.2 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних уражень .....                                         | 68 |
| 2.3.3 Гістологічне дослідження ендометріюїдних уражень .....                                          | 69 |
| 2.3.4 Загально-клінічні, клінічні та імунологічні методи дослідження.....                             | 70 |
| 2.3.5 Методи статистичного аналізу.....                                                               | 72 |
| 2.3.6 Методи об'єктивізації імуногістохімічних зображень .....                                        | 74 |
| РОЗДІЛ 3 Імплементация та верифікація моделі експериментального ендометріозу.....                     | 75 |
| 3.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                             | 77 |
| 3.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                              | 80 |

|                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| РОЗДІЛ 4 Характеристика експериментального перитонеального ендометріозу при застосуванні патогенетичної терапії.....                                   | 88  |
| 4.1 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів.....                                          | 88  |
| 4.1.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                                                                            | 89  |
| 4.1.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                                                                             | 93  |
| 4.1.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                                                                        | 99  |
| 4.2 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів та високо-селективного інгібітора ЦОГ-2 ..... | 104 |
| 4.2.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                                                                            | 105 |
| 4.2.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ.....                                                                                             | 109 |
| 4.2.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріюїдних вогнищ .....                                                                                       | 114 |
| 4.3 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні високо-селективного інгібітора ЦОГ-2 .....                                    | 120 |
| 4.3.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ .....                                                                                           | 121 |
| 4.3.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ .....                                                                                            | 125 |
| 4.3.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріюїдних вогнищ .....                                                                                       | 129 |
| РОЗДІЛ 5 Морфологічна та імуногістохімічна характеристика ендометрія у жінок основної та дослідної груп .....                                          | 136 |
| 5.1 Клінічні особливості соматичного та репродуктивного анамнезу у жінок досліджуваних груп .....                                                      | 135 |
| 5.2 Роль желатиназ (матриксних металопротеїназ) та ангіонеогенетичних факторів у клініці раннього ендометріозу .....                                   | 140 |
| 5.3 Гістологічне дослідження зразків дослідної та контрольної груп .....                                                                               | 142 |
| 5.4 Показники експресії матричних металопротеїназ (ММР-2 та ММР-9) у дослідній та контрольній групах (імуногістохімічне дослідження) .....             | 144 |
| 5.5 Показники експресії рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту (VEGFR-2) у дослідній та контрольній групах .....                       | 151 |



|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
|                                                               | 17  |
| 5.6 Регресійний аналіз отриманих даних .....                  | 155 |
| РОЗДІЛ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження ..... | 159 |
| ВИСНОВКИ .....                                                | 173 |
| ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ .....                                  | 177 |
| ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ .....                        | 177 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....                              | 178 |
| ДОДАТКИ .....                                                 | 207 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- АТХ – анатомо-терапевтично-хімічна класифікація
- ГнРГ – гонадотропін-рилізинг гормон
- ДІ – довірчий інтервал
- Е2 – естрадіол
- ЕКП – ендотеліальні клітини-попередники
- ММП, ММР – матриксна металопротеїназа
- МПА – медроксипрогестерону ацетат
- ПГЕ<sub>2</sub> – простагландин Е<sub>2</sub>
- ПЗ – програмне забезпечення
- ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2
- СВГ – агоніст дофамінових рецепторів
- iCOX – високоселективний інгібітор ЦОГ-2
- ІЛ – інтерлейкін
- НК – натуральні кіллери
- NOD-SCID – миші, що страждають на діабет без ожиріння з важким комбінованим імунодефіцитом
- SCID – миші з важким комбінованим імунодефіцитом
- TNF- $\alpha$  – фактор некрозу пухлин  $\alpha$
- VEGF – судинно-ендотеліальної фактор росту
- VEGFR – рецептор до судинно-ендотеліального фактора росту
- TIMP – тканинні інгібітори металопротеїнази
- ІНС – імуногістохімія
- HRP – стрептавідин
- DAB – діамінобензидин
- HE4 – білок епідідімусу людини 4
- CA-125 – вуглеводний антиген-125
- ІГХ – імуногістохімічне зображення

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Генітальний ендометріоз діагностують у 5-10% жіночої популяції – у світі існує приблизно 176 млн жінок з ендометріозом, переважно репродуктивного віку [1, 2]. Ендометріоз виявляють у 50% жінок з дисменореєю, в тому числі у половини підлітків із важкою дисменореєю, у 50-80% пацієнок із хронічним тазовим болем [3] і у 25-40% жінок із безпліддям, а в структурі гінекологічної захворюваності генітальний ендометріоз займає третє місце після запальних процесів та лейоміоми матки [3-5]. Симптоми, які асоціюються з ендометріозом, можуть негативно впливати на фізичний, психологічний, соціальний добробут і репродуктивне здоров'я [6-8].

Враховуючи не надто високу ефективність існуючих методів лікування, значний відсоток рецидивів захворювання після припинення застосування лікарських засобів, а також високу частоту виникнення побічних дій при проведенні медикаментозної терапії [5, 9], питання оптимізації лікувальної тактики ендометріозу й досі залишаються актуальними.

На сьогоднішній день в іноземній літературі є поодинокі повідомлення щодо пригнічення проліферації, а також регресії ендометріюїдних гетеротопій під впливом деяких агоністів дофаміну [10] і інгібіторів циклооксигенази-2 [11-13]. При цьому визначальну роль при перитонеальному ендометріозі відіграє стан перитонеальної рідини, а саме стан її про- та протизапальних цитокінів перитонеальної рідини [13-15]. Внаслідок порушення даного балансу виникає імплантація ендометріюїдних клітин [16]. Адекватне кровопостачання та ангіонеогенез відіграють важливу роль в успішній імплантації та виникненні ектопічних вогнищ.

Враховуючи вищевикладене слід припустити, що одним із перспективних напрямків консервативного лікування перитонеального ендометріозу є вплив на одну з патогенетичних ланок, а саме пригнічення ангіонеогенезу шляхом

застосування агоністів дофамінових рецепторів з метою інгібування активності судинно-ендотеліального фактора росту та інгібіторів циклооксигенази-2.

На даний момент не встановлено патогномонічних ознак або біомаркерів, достатніх для чіткої ранньої діагностики перитонеального ендометріозу. Основні клінічні симптоми, такі як тазовий біль та безпліддя, можуть мати безліч причин. Незважаючи на те, що лапароскопія з подальшим гістологічним дослідженням ектопій вважається «золотим стандартом» [15], наявність ендометріюїдних уражень не виключає наявності іншої етіології симптомів у пацієнтки, а відсутність очевидних уражень не виключає наявність ендометріозу, що значно ускладнює ранню діагностику даної патології [17].

Відомо, що ремоделювання ендометрія, яке має місце під час проліферативної та менструальної фаз менструального циклу, супроводжується підвищеною експресією матричних металопротеїназ [18]. Матричні металопротеїнази-2 і -9 можуть виступати як можливі маркери ендометріозу, так як беруть участь у реконструкції компонентів позаклітинного матриксу при різних фізіологічних та патологічних процесах [19]. Точний контроль у відповідний момент часу рівня експресії та функції матричних металопротеїназ має величезне значення для нормального перебігу фізіологічних процесів. Аномальна експресія матричних металопротеїназ безсумнівно може призвести до патофізіологічних змін у результаті зміни клітинної поведінки. Регуляція експресії матричних металопротеїназ може проходити через циклооксигеназа-2 / простагландин E2-протеїназний шлях. Існує циклооксигеназа-2 / простагландин E2-опосередкований ангіогенез, при якому відбувається активація альтернативних факторів ангіогенезу, не пов'язаних з судинно-ендотеліальним фактором росту.

Таким чином, вивчення морфофункціональних властивостей ендометріюїдних гетеротопій, встановлення їх зв'язку з клініко-лабораторними показниками є перспективним напрямком досліджень, який дозволить

розширити можливості прогнозування та ранньої малоінвазивної діагностики перитонеального ендометріозу в жінок.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри акушерства та гінекології Буковинського державного медичного університету «Сучасні аспекти збереження та відновлення репродуктивного здоров'я жінки при акушерській та гінекологічній патології» (номер державної реєстрації 0116U002939), де дисертант є співвиконавцем.

**Мета дослідження:** встановити нові можливості діагностики та лікування ранніх стадій перитонеального ендометріозу на підставі експериментального дослідження на лабораторних щурах впливу агоністу дофамінових рецепторів і високоселективного інгібітору циклооксигенази-2 на ендометріюїдні гетеротопії та підвищити ефективність ранньої діагностики перитонеального ендометріозу в жінок на підставі логістичного регресійного аналізу їх клінічних і імуногістохімічних даних і розробки прогностичної моделі.

**Завдання дослідження:**

1. Визначити морфофункціональні особливості ендометріюїдних гетеротопій у щурів з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом порівняно з еутопічним ендометрієм інтактних тварин.

2. Дослідити вплив агоністу дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітору циклооксигенази-2 на розвиток ендометріюїдних гетеротопій у щурів з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом.

3. Охарактеризувати особливості експресії матричних металопротеїназ-2 і -9 в еутопічному та ектопічному ендометрії жінок з перитонеальним ендометріозом.

4. Визначити експресію рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в ектопічному та еутопічному ендометрії жінок, які страждають

на перитонеальний ендометріоз, а також кореляцію його експресії в ендометріюїдних гетеротопіях з вмістом в еутопічному ендометрії жінок без ендометріозу.

5. Вивчити кореляційні зв'язки між експресією матричних металопротеїназ-2 і -9, рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в еутопічному ендометрії й наявністю перитонеального ендометріозу в жінок.

6. На основі багатофакторного аналізу отриманих клінічних і імуногістохімічних даних розробити прогностичну модель наявності перитонеального ендометріозу в жінок, оцінити її чутливість та специфічність.

*Об'єкт дослідження:* перитонеальний ендометріоз у експериментальних тварин та в жінок репродуктивного віку.

*Предмет дослідження:* морфофункціональні особливості ендометріюїдних гетеротопій у статевозрілих самок білих щурів з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом та вплив на ендометріюїдні вогнища в них агоністу дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітору циклооксигенази-2; клініко-анамнестична характеристика, рівні онкомаркерів периферичної крові, експресія матричних металопротеїназ -2 і -9, рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в еутопічному та ектопічному ендометрії жінок з перитонеальним ендометріозом; ефективність регресійної статистичної моделі прогнозування перитонеального ендометріозу в жінок.

*Методи дослідження:* експериментальні (з метою індукції перитонеального ендометріозу у щурів і вивчення впливу на нього лікарських засобів), загально-клінічні, біохімічні, імунологічні (для відстеження біохімічних та імунологічних показників у пацієток, включених до груп дослідження), морфологічні (для характеристики еутопічного та ектопічного ендометрія), імуногістохімічні (для вивчення експресії матричних металопротеїназ -2 і -9, рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора

росту в еутопічному та ектопічному ендометрії), статистичні (для аналізу отриманих результатів).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Автором суттєво доповнені уявлення про патогенез перитонеального ендометріозу. Визначено, що морфофункціональними особливостями ендометріюїдних гетеротопій у щурів з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом порівняно з еутопічним ендометрієм інтактних тварин є вірогідно збільшена висота епітеліоцитів та висота їх секреторного полюсу на тлі відсутності відмінностей у розмірах, відносної щільності ядра і відносної щільності клітин. Доведена підвищена експресія рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту у вигляді поодиноких скупчень імунопозитивних клітин в ділянках новоутворених капілярів, в їх просвіті або в місцях майбутнього розвитку капілярів; матричної металопротеїнази-2 – в епітелії, субепітеліальних ділянках, в цитогенній стромі й навколо судин; матричної металопротеїнази-9 – переважно в епітелії та в цитогенній стромі.

На підставі імуногістохімічного визначення рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту, матричних металопротеїназ-2 і -9 показано, що агоніст дофамінових рецепторів є високоактивним інгібітором ектопічного ендометрія. У той же час застосування агоніста дофамінових рецепторів в якості інгібітора рецепторів 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в комбінації з високоселективним інгібітором циклооксигенази-2 у щурів з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом не призводить до потенціювання чи сумації їх ефектів.

Показана підвищена експресія матричних металопротеїназ-2 і -9 в еутопічному ендометрії і в ендометріюїдних гетеротопіях на очеревині в жінок з перитонеальним ендометріозом, що може сприяти деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу, а також інвазії ендометріюїдної тканини в підлеглу тканину міометрію та очеревини.

Виявлена відсутність вірогідної різниці експресії рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в еутопічному ендометрії жінок та без перитонеального ендометріозу. Визначено, що оптична щільність імунопозитивних клітин до рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в ендометріїдних гетеротопіях надмірно перевищує аналогічну в еутопічному ендометрії жінок з та без перитонеального ендометріозу.

Встановлена пряма кореляція при перитонеальному ендометріозі між експресією матричної металопротеїнази-2 і матричної металопротеїнази-9 в еутопічному та ектопічному ендометрії, що вказує на те, що імуногістохімічне визначення експресії матричних металопротеїназ-2 і -9 в еутопічному ендометрії має діагностичне та прогностичне значення і може використовуватися для раннього виявлення перитонеального ендометріозу.

Вперше оцінена чутливість та специфічність розробленої прогностичної моделі наявності перитонеального ендометріозу в жінок.

**Практичне значення отриманих результатів:** доведена доцільність використання агоністу допамінових рецепторів в лікуванні перитонеального ендометріозу на експериментальній моделі перитонеального ендометріозу у статевозрілих самок білих щурів; запропонована регресійна статистична модель прогнозування перитонеального ендометріозу у жінок.

Результати дисертаційного дослідження впроваджено в лікувальну практику КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», а також впроваджено в навчальному процесі на кафедрах акушерства та гінекології та кафедрі патофізіології Буковинського державного медичного університету, що підтверджено відповідними актами впровадження.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно здійснено науковий пошук у вітчизняних та закордонних наукових джерелах, самостійно проведено оперативні втручання на статевозрілих самках білих щурів з метою отримання моделі ендометріозу, самостійно проведено макроскопічну морфометрію, автором самостійно проведено набір матеріалу для гістологічного дослідження,



самостійно проведено статистичну обробку отриманих результатів. Автором разом із науковим керівником сформульовані висновки. Автор самостійно та за співавторства підготував наукові дані до публікації. У опублікованих працях автору належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

**Апробація результатів роботи.** Основні положення та висновки дисертаційної науково-кваліфікаційної роботи було оприлюднено та обговорено на: науково-практичній конференції студентів і молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині» (Івано-Франківськ, 2016); XIV щорічній науково-практичній конференції "Uzhhorod Medical Students Conference" (Ужгород, 2016); XX міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Тернопіль, 2016); XIII Міжнародній конференції студентів і молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2016).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 5 статей у фахових виданнях (у т.ч. дві, що індексуються в наукометричній базі Scopus, одна з яких – у журналі Q3 за класифікацією SCImago Journal & Country Rank), 6 тез доповідей у матеріалах наукових форумів; отримано 1 патент України на корисну модель.

**Обсяг та структура дисертаційної роботи.** Робота викладена на 216 сторінках (147 сторінок основного тексту), складається з анотацій, вступу, огляду літератури, розділу матеріалу та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та їх узагальнення, висновків, списку 274 використаних джерел, 4 додатків. Робота ілюстрована 13 таблицями, 141 рисунком.

## РОЗДІЛ 1

### ГЕНІТАЛЬНИЙ ЕНДОМЕТРІОЗ – СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Під терміном «ендометріоз» розуміють наявність функціонально активних ендометріальних залоз і стромы, які розміщені ектопічно, поза порожниною матки. З часу першого опису цього захворювання в середині ХІХ століття обізнаність лікарів щодо нього значно зросла, і нині ендометріоз діагностується все частіше. Це одне з найбільш поширених захворювань, з якими стикаються гінекологи. Проте, незважаючи на десятки років досліджень і клінічного досвіду, його причини та лікування залишаються суперечливими [20].

Ендометріоз спочатку описали в двох варіантах. Внутрішній ендометріоз, тобто проростання ендометрії у міометрій, нині називають аденоміозом. У сучасній термінології назва збереглась за так званим зовнішнім ендометріозом — наявністю імплантованого ендометрії в будь-якому іншому місці. Хоча ендометріоз і вважається доброякісним захворюванням, він має здатність до інвазивного росту і поширення, розповсюдження шляхом інтраперитонеального обсіювання та з плином крові. Ці два процеси відрізняються як патогенезом, так і симптоматикою, і є за своєю суттю клінічно різними захворюваннями [21].

#### 1.1 Зовнішній генітальний ендометріоз: сучасний стан проблеми, теорії генезу

##### 1.1.1 Сучасні теорії встановлення ендометріодних уражень

Ендометріоз це естроген-залежне, хронічне, прозапальне захворювання, яке зустрічається у 10% жінок репродуктивного віку в усьому світі. Характеризується ростом тканин подібних до ендометрія, в аберантні локалізації, поза маткою та є причиною симптомів, включаючи хронічний

тазовий біль, дисменорею та субфебрилітет, які знижують якість життя жінок значною мірою. В Канаді прямі та непрямі економічні витрати досягають до 1,8 мільярдів доларів США, а у США – 20 мільярдів доларів США. Незважаючи на декади досліджень, етіологія та патофізіологія ендометріозу досі залишаються нез'ясованими.

Ендометріоз – це гінекологічний стан, який характеризується ростом ендометріод-подібних тканин поза матковою порожниною. Ендометріоз діагностовано майже у 50% підлітків з дисменореєю та тазовим болем, які погано піддаються лікуванню та у 4% жінок, які перенесли лігування маткових труб [22]. Було чітко встановлено, що багато жінок мають запізнення при встановленні діагнозу ендометріозу, незважаючи на значну дисменорею та інші симптоми, які мають тісне відношення, починаючи з юного віку [23]. Одним із важливих факторів, який сприяє діагностичному запізненню, є недостатність неінвазивних методів для діагностики ендометріозу. Хоча ендометріоз може протікати асимптоматично, хронічний тазовий біль, який агравує протягом менструації, а також субфертилітет підштовхують жінок до пошуку допомоги. Базуючись на наукову доказовість, що ріст ендометріозу залежить від естрогенів, сучасні фармацевтичні втручання фокусуються переважно на пригнічення естрогенів шляхом використання комбінованих оральних контрацептивів або препаратів, які пригнічують оваріальну секрецію естрогенів. Ці фармацевтичні впливи є ефективними при менеджменті болю та зменшенні ендометріодних уражень у певній мірі. Однак, висока частка рецидивів ендометріозу після фармацевтичного лікування або хірургічної абляції наштовхує дослідників на пошук інших шляхів лікування, які можуть ефективно боротися проти ендометріозу, – як із симптоматичними проявами, так і з виліковуванням від захворювання.

Найбільш широко прийнятою теорією патогенезу ендометріозу є теорія ретроградної менструації Семпсона. Дана теорія припускає, що життєздатні фрагменти ендометріальної тканини дисемінуються в перитонеальну

порожнину або в органи малого тазу [24, 25]. Хоча тільки у 1-10% діагностовано ендометріоз, було виявлено, що у 75-90% практично здорових жінок виникають ретроградні менструації, як це можна спостерігати при лапароскопії під час менструального або в перименструальному періоді [26, 27]. Хоча збільшення менструального закиду крові в очеревинну порожнину у жінок з ендометріозом може бути фактором розвитку ендометріозу, ймовірно, що жінки із даним захворюванням мають фундаментальну різницю в генетичних, імунологічних або біохімічних факторах, які сприяють розвитку ендометріозу. Теорія Семпсона підтверджується жінками з цервікальним стенозом або іншими конгенітальними обструкціями, які заважають відтоку менструальної крові. Ці жінки мають підвищений ризик розвитку ендометріозу [28, 29]. Дані спостереження були повторені в моделі ендометріозу на павіанах, в яких був індукований цервікальний стеноз [30], ймовірно через підвищення ступеня ретроградної менструації. Окрім цього, було показано, що інтраперитонеальна ін'єкція менструального ендометрія успішно індукує перитонеальний ендометріоз у моделі на павіанах, де в 3-ох із 4-ьох павіанів, які були залучені в дослідженнях, лапароскопічно було виявлено та підтверджено ендометріодні ураження через 12 місяців [31]. Незважаючи на багато доказів на користь даної теорії, випадки ендометріозу у дівчат, які ще не менструують (пременархальні дівчата), у новонароджених та навіть у самців, – усі вони вимагають додаткових пояснень [32].

Теорія целомічної метаплазії постулює, що ендометріоз виникає внаслідок метаплазії клітин, які покривають вісцеральну та парієтальну очеревину на фоні гормональних, екологічних або інфекційних стимулів. Основа даної теорії полягає у ембріологічних дослідженнях, які розкривають, що абдомінальна, тазова очеревина, Мюллерові протоки та зародковий епітелій яєчника походять з целомічного епітелію ембріону. Враховуючи, що клітинний матеріал, який складає очеревину та ендометрій має спільне ембріональне походження, – яким є целомічний епітелій, – існує вірогідність, що

вищезазначені стимули можуть запустити трансформацію клітин очеревини в клітини ендометріального типу. Дана теорія може надати пояснення стосовно вищезгаданих випадків ендометріозу, які неадекватно пояснюються теорією ретроградної менструації, а також випадки ендометріозу в ектопічних локалізаціях, як-то легені. Зважаючи на це, метастазування – це феномен, який росте разом із віком, що не може пояснити різке зниження рівня захворюваності ендометріозу після менопаузи у жінок похилого віку [32, 33]. Аналогічно, теорія ембріональних залишків припускає, що ураження розвиваються з клітин, які залишаються після міграції Мюллерових протоків протягом ембріонального розвитку внаслідок специфічних стимулів, таких як естрогени, які відіграють вкрай важливу роль у патогенезі ендометріозу [34].

Останнім часом теорія стовбурових клітин отримала багато уваги, так як кілька рядків експериментальних даних показали участь як ендометріальних стовбурових/прогеніторних клітин кісткового мозку так і стовбурових клітин у патогенезі ендометріозу. Вважається, що ендометріальні стовбурові клітини/прогеніторні клітини з базального шару ендометрія можуть проникнути за допомогою ретроградної менструації, лімфатичної або судинної дисемінації в очеревинну порожнину та перерости у вогнища ендометріозу. Посилений проліферативний потенціал стовбурових клітин та їх здатність диференціюватися у різні типи клітин може надавати цим клітинам селективну перевагу при утворенні та прогресуванні ураження [33]. Leyendecker та ін. (2002) [35] виявили, що не тільки експресія рецепторів до естрогену, рецепторів до прогестеронів та ароматази P450 є однаково вираженою в базальному шару ендометрія та в ектопічному ендометріальному ураженні, а також те, що фрагменти базального шару ендометрія відторгаються з більшою частотою у жінок з ендометріозом. Гематогенна дисемінація з кісткового мозку стовбурових клітин також можуть мати свій внесок у патогенез ендометріозу. В одному експерименті, гістеректомізованим LacZ трансгенним мишам з експериментально індукованим перитонеальним ендометріозом згодом було

проведено трансплантацію кісткового мозку від LacZ трансгенних миш. LacZ-екскретуючі клітини були виявлені в ектопічному вогнищі, демонструючи потенціал участі стовбурових клітин кісткового мозку у виникненні та персистенції захворювання [36]. Теорія стовбурових клітин надає пояснення для виключень, при яких інші теорії не можуть надати та демонструє великий потенціал, як теорія, яка описує патогенез ендометріозу.

Після транслокації тканин ендометрія в очеревинну порожнину, фрагменти ендометрія повинні уникнути природний захист організму, прикріпитись до поверхні, а потім послідовно проникнути та модифікувати перитонеальну мембрану з метою формування вогнища. Було показано, що еутопічний ендометрій жінок з ендометріозом значно відрізняється від такого ж ендометрія від здорових жінок. Еутопічні ендометріальні клітини у жінок з ендометріозом не тільки більш стійкі до клітинно-опосередкованої імунної атаки [37], проте також мають підвищену проліферативну здатність [38] та підвищену експресію ароматази, що призводить до підвищення концентрації естрогену, яка опосередкована через простагландин  $E_2$  [39]. Ці зміни можуть бути результатом спадкових або набутих генетичних факторів. Дослідження показують, що ризик ендометріозу у 6 разів вищий, коли жінка має родичів першого ступеня спорідненості з важкою формою ендометріозу [40].

Поліморфізм у генах, залучених в процесі детоксикації, рецептори естрогенів, цитокінів, імуномодулюючі протеїни (наприклад, toll-подібні рецептори), і фактори, які беруть участь, як в прикріпленні, так і в інвазії, були досліджені та підтверджені в жінок з ендометріозом. Неповноцінний імунний нагляд також вважається фактором, що сприяє розвитку здатності ендометрія до повноцінного встановлення ураження.

Прикріплення тканин ендометрія може бути більш легким при великих фрагментах, завдяки непошкодженій цілісності клітин та складу тканини [41]. Наявні на даний момент знання припускають, що ендометріальні стромальні клітини беруть участь у прикріпленні ураження, а ендометріальні залозисто-

епітеліальні клітини в першу чергу відіграють роль у інвазії та рості вогнища [42]. Аномальний профіль експресії інтегрину еутопічного ендометрія у жінок із ендометріозом може відігравати основоположну роль в імплантації ендометріальних клітин до колагену типу I та IV, фібронектину, вітронектину, тенаскіну та ламініну очеревини [42].

Після прикріплення настає деградація позаклітинного матриксу, дозволяючи ендометріальним клітинам з яких будуть розвиватися ураження проникнути та потенційно зафіксуватися. Було показано, що ендометрій жінок із ендометріозом має підвищений протеолітичний потенціал. Аномальна експресія білків системи активаторів плазміногену, а також різноманітних матриксних металопротеїназ (ММП), схоже відповідають за дане явище [43]. Нещодавні дослідження показали, що рівень ММП-2, ММП-3, ММП-7 та ММП-9 є підвищеними при ендометріозі [44]. Окрім цього, було показано, що активатор плазміногену урокіназного типу (uPA), який каталізує перетворення плазміногену в плазмін, є підвищеним в еутопічному ендометрії та ектопічних ендометріюїдних ураженнях, так само як і в перитонеальній рідині у жінок із ендометріозом [43, 45]. Плазмін бере участь у деградації білків позаклітинного матриксу, а також в активації ММП і факторів росту і, таким чином, ймовірно, відіграє важливу роль у встановленні вогнища [45].

#### 1.1.2 Підвищена продукція естрадіолу та прогестеронова резистентність при ендометріозі

Як обговорювалося раніше, найбільш широко прийнята теорія ретроградної менструації стверджує, що патогенез ендометріозу починається з інвазії та проліферації менструальних стоків в перитонеальній рідині. Звідси, дослідження показують, що аберантні імунні механізми та реакція на стероїди, що виділяються яєчниками, знайдені тільки у частини жінок, можуть призвести до розвитку ендометріюїдних вогнищ у перитонеальній мембрані. Цікаво, що в експериментальній моделі на павіанах, ендометрій з менструальної фази, який

вводили внутрішньоочеревинно показав підвищену адгезію до перитонеальної мембрани в порівнянні із ендометрієм лютеїнової фази [31]. Це говорить про те, що фрагменти ендометрія в менструальній фазі експресують селективні фактори, які ще належить характеризувати, що дозволяє подальшу імплантацію в аберантних місцях. При нормальних фізіологічних умовах ендометрій людини знаходиться під циклічною регуляцією естрогенів та прогестерону, з проліферацією, диференціацією та десквамацією поверхневого, функціонального шару ендометрії, якщо імплантація не відбулася. Однак, клітинні компоненти ектопічного вогнища ендометріозу реагують на стероїдні гормони яєчників по-іншому, порівняно з нормальним еутопічним ендометрієм [46]. Макроскопічно видима структурна мальформація ендометріального епітелію у жінок з ендометріозом може бути одним з пояснень збільшення випадків неплідності у жінок з ендометріозом [47] і, можливо, надає пояснення, чому тільки у частини жінок розвивається ендометріоз.

Естрадіол ( $E_2$ ), біологічно активна форма естрогену, відіграє важливу роль у процесі відновлення ендометрія після менструації. Проліферація ендометрію і відновлення судинної мережі функціонального шару ендометрія керується впливом  $E_2$ , взаємодіючи із ядерними рецепторами, ER- $\alpha$  та ER- $\beta$ . Ендометріальний  $E_2$  утворюється переважно в яєчниках, а також в позаоваріальних тканинах, таких як надниркові залози та адіпоцити, які надходять у тканини через кровообіг. Ароматаза P450 є ферментом, який каталізує перетворення оваріального андростендіону в естрон. Звідти, 17 $\beta$ -гідроксистероїддегідрогеназа типу 1 (17 $\beta$ -HSDT1) в подальшому каталізує перетворення естрону в  $E_2$ . Простагландин  $E_2$  (ПГЕ $_2$ ) синтезується з арахідонової кислоти залежно від активності лімітуючого ферменту циклооксигенази-2 (ЦОГ-2). ПГЕ $_2$  індукує продукування ароматази P450 через цАМФ каскад клітинної сигналізації в ектопічних ендометріальних стромальних клітинах дозозалежним чином [48]. В ендометрії здорових жінок активність ароматази P450 не визначається [48]. Однак, як і ендометрій, так і



ендометріодні ураження у жінок з ендометріозом експресують цей фермент у значно більшій кількості, таким чином сприяючи місцевому утворенню  $E_2$ . Можливість ендометріодного ураження виробляти  $E_2$  de novo, поряд із продукуванням ферментів, необхідних для цього, може сприяти імплантації фрагментів ендометрія у черевну порожнину [48, 49].

Зважаючи на значну роль  $E_2$  в патогенезі ендометріозу, існують різні фармацевтичні заходи, які спрямовані на пригнічення утворення естрогенів, проте з перемінним успіхом. Найчастіше симптоми болю можуть бути усунені під час лікування, однак, з припиненням лікуванням, біль часто з'являється негайно. Більше половини хворих, які використовували прогестини, повідомили про рецидив тазового болю після припинення лікування [50]. Окрім того, довгострокове використання ліків може викликати небажані побічні ефекти, до яких належать проривні кровотечі, збільшення ваги та втрата мінеральної щільності кісток від лікування, яке містить агоністи ГнРГ (гонадотропін-рилізінг гормон) та депо-форми прогестинів (медроксипрогестерону ацетат) [51]. Третя лінія терапії, інгібітори ароматази, може бути використана в поєднанні з іншими типами інгібіторів, які спрямовані на пригнічення естрогенів. Проте, у деяких жінок розвивається резистентність до поточної гормональної терапії, тому подальші дослідження необхідні для поліпшення таргетингу поточних терапевтичних заходів [52].

Додатково, до посиленої локальної продукції  $E_2$  в ендометрії, як еутопічному, так і ектопічному, у жінок з ендометріозом резистентність до прогестерону вносить свій внесок у патогенез ендометріозу. Прогестерон, який виробляється в основному під час секреторної фази менструального циклу, гальмує дію естрогену і готує ендометрій до імплантації. Процесу децидуалізації, під час якого ендометріальні клітини починають диференціюватися, сприяє прогестерон. Аналогічно естрогену, прогестерон взаємодіє з двома рецепторними ізоформами – PR-A та PR-B, кожен з яких має різні функції. Генна абляція PR-A у мишей призводить до аномалій матки та

яєчників, в той час як абляція гена PR-B не впливає на функцію матки або яєчників [53]. Крім того, транскрипція як PR-A, так і PR-B виконуються з одного гену з коротшою транскрипцією для PR-A та довшою для PR-B, що приводить до здатності PR-A стати трансрепресором для PR-B та інших ядерних рецепторів [53]. Цікаво, що вогнищам ендометріозу бракує PR-B та трансрепресор PR-A ледь виражений [54]. Це є свідченням того, що прогестеронова резистентність при ендометріозі має місце на молекулярному рівні. Знижена реакція на прогестерон отримала подальший розвиток у роботі Bulun та ін. (2006) [38], яка вказує на зниження чутливості ендометріюїдних клітин цитогенної стромы до прогестерону шляхом вимірювання рівнів мРНК пролактину, який зазвичай індукується прогестероном. Лікування ендометріюїдних стромальних клітин медроксипрогестероном ацетату (МПА), синтетичний аналог прогестерону, призвело до значно нижчого рівня мРНК пролактину в порівнянні з еутопічними ендометріальними стромальними клітинами [38]. Така стійкість до прогестеронового лікування забезпечує підвищення локальної концентрації E2 через нездатності прогестерону до активації 17 $\beta$ -гидроксистероїддегідрогенази типу 2 (17 $\beta$ -HSDT2), яка каталізує деактивацію E2 у естрон [55]. Як правило, прогестерон опосередковані фактори ендометріальних стромальних клітин індують експресію 17  $\beta$ -гидроксистерондегідрогенази типу 2 з ендометріальних епітеліальних клітин в паракриновій манері. Цей механізм був пригнічений у лінії ендометріальних епітеліальних клітин Ishikawa, які були культивовані з умовним середовищем від ектопічних ендометріюїдних стромальних клітин [55]. Таким чином, дослідження показують, що на відміну від еутопічного ендометрія, прогестеронова резистентність виникає переважно в ектопічних ендометріюїдних вогнищах, які можуть сприяти локальному підвищенню E2, що в подальшому може сприяти зростанню ендометріюїдних вогнищ.

### 1.1.3 Ангіогенез та васкулогенез при ендометріозі

До ангіогенезу відноситься складний процес формування нових кровоносних судин з раніше існуючих судин. Цей процес відіграє основоположну роль в розмноженні, розвитку, а також при загоєнні ран. У дорослих проліферація ендотелію є суворо регульованим процесом, який базується на балансі між ангіогенними та ангіостатичними факторами, які активуються, коли необхідно, а згодом повністю гальмуються, коли усувається необхідність [56]. Випадки збільшення швидкості проліферації ендотеліальних клітин часто пов'язані з пухлинами та їх розвитком [57], які, як відомо, для росту та метастазування залежать від ангіогенезу [58]. Васкулогенез, з іншого боку, являє собою процес формування нових кровоносних судин, що розпочинається з міграції, проліферації та включення ангіобластів або ендотеліальних клітин-попередників з кісткового мозку, – зазвичай відбувається під час ембріогенезу [57]. Вживання ендометріюїдних імплантів у перитонеальній мембрані в очеревинній порожнині залежить від утворення кровопостачання для забезпечення киснем та поживними речовинами уражень, що розвиваються. Вогнища ендометріозу густо васкуляризовані [59]. Аналогічно процесу васкуляризації пухлини, ендометріоз може використовувати механізми ангіогенезу та васкулогенезу для утворення власної судинної мережі для підтримки життєдіяльності.

Уламки ендометрія, які відділяються від ендометрії матки, можуть бути носіями ангіогенного потенціалу за рахунок наступних характеристик. Ендометрій людини, який складається з функціонального та базального шару – це унікальний орган, який піддається проліферації, диференціюванню і регенерації при кожному менструальному циклі під дією стероїдних гормонів яєчників – естрогенів та прогестерону. Поряд із ростом ендометрія, судинне русло ендометрія зазнає проліферації та регенерації кожного циклу під впливом стероїдів яєчників, особливо E<sub>2</sub>. Shifren та співавт. (1996) [60] визначили підвищену експресію мРНК вазального ендотеліального фактору росту судин

(VEGF) у функціональному шарі ендометрії у проліферативній та секреторній фазі менструального циклу, що вказує на причетність ангиогенезу. У цьому ж дослідженні виявлено, що  $E_2$  відповідає за стимуляцію експресії VEGF у ізольованих людських клітинах ендометрія, а застосування  $E_2$  призводило до збільшення експресії мРНК VEGF порівняно із ендометріальними клітинами без стимулу  $E_2$ . Можна припустити, що ендометріоз виникає в результаті імплантації фрагментів ендометрії в черевну порожнину. Враховуючи, що здоровий ендометрій показує вроджений ангиогенний потенціал під регуляцією  $E_2$ , очевидно, що аберантно регульована експресія VEGF та рівень  $E_2$  може сприяти неоваскуляризації ендометріюїдних уражень, які підтримують їх розвиток в ектопічних місцях.

Дійсно, VEGF відіграє важливу роль у сприянні процесу ангиогенезу при ендометріозі. Це вазоактивна речовина, яка бере участь у різних нормальних фізіологічних процесах, включаючи загоєння ран і реваскуляризацію ендометрія, є посередником у проліферації ендотелію та міграції. При туморогенезі концентрація VEGF зазвичай корелює із посиленням кровопостачання в різних видах тканин, які асоційовані з пухлиною [61]. В нормальному ендометрії мРНК VEGF та експресія білків можуть бути викликані гіпоксією [62]. Не дивно, що перитонеальна рідина жінок з останніми стадіями ендометріозу містить більш високі концентрації VEGF порівняно з жінками, які страждають на легку форму ендометріозу або порівняно зі здоровими жінками [63]. Крім цього, підвищений рівень концентрації VEGF у перитонеальній рідині та плазмі крові у жінок з ендометріозом позитивно асоціюється із підвищеною проліферативною активністю та щільністю мікросудин у вогнищі ендометріозу [64], що вказує на його участь у розвитку судин. Різні джерела VEGF було виявлено, включаючи ендометріюїдні ураження [65] та макрофаги перитонеальної рідини, які підвищують експресію VEGF при обробці оваріальними стероїдами, такими як  $E_2$  та прогестерон [66], зміцнюючи поняття, що VEGF бере участь при ангиогенезі, асоційованому з

ендометріальними ураженнями. Інші ангіогенні цитокіни, включаючи IL-1 $\beta$ , IL-6, та IL-8 будуть розглянуті нижче в даному огляді.

Було загальноприйнято, що васкулогенез може відбуватися лише в період ембріогенезу, а постнатальна неоваскуляризація тканин відбувається виключно за допомогою ангіогенезу [67]. Парадигма змістилася з виявленням циркулюючих ендотеліальних клітин-попередників (ЕКП) з фенотипічними характеристиками ендотеліальних клітин *in vitro* в периферичній крові у дорослих [68]. Дане дослідження, як доповнення до результатів, які були опубліковані два роки назад, показало наявність та активне залучення ЕКП кістково-мозкового походження у неоваскуляризації тканин, у тому числі ендометрії [69]. Vesker та співавт. (2011) підтвердили включення ЕКП кістково-мозкового походження в судинній мережі ендометрію одного ураження шляхом пересадки GFP+ клітин кістково-мозкового походження мишам з хірургічно індукованим ендометріозом [70].

Окрім того, різні типи імунних клітин залучені в процес ангіогенезу, виробляючи прозапальні та ангіогенні цитокіни та збільшенням їх концентрації в перитонеальній рідині, яка омиває вогнища ендометріозу [71]. Lin та співавтори (2006) [72] з'ясували значимість імунних клітин продемонструвавши, що ангіогенез в ендометріюідних ураженнях відбувається після проникнення нейтрофілів та макрофагів, які секретують VEGF в ураження, а також в очеревину порожнину, що вказує на істотну роль інфільтрації лейкоцитів у мишачій моделі ендометріозу. Окрім цього, була вказана участь дендритних клітин при ендометріозі. Дослідження, проведене Faïnaru та співавт. (2008) [73] підтримує цей аргумент, демонструючи підвищений периваскулярний розподіл незрілих дендритних клітин, які експресують VEGFR-R в ендометріальних ураженнях, а також здатність індукувати міграцію ендотеліальних клітин *in vitro*. Наявність дендритних клітин в очеревинній порожнині призвело до зростання ендометріюідних уражень і васкуляризації ендометріюідних уражень у розглянутій вище моделі

ендометріозу на мишах. В іншому дослідженні, з використанням трансгенної мишачої моделі з умовним виснаженням дендритних клітин, дослідники виявили, що ендометріодні вогнища у мишей із виснаженими дендритними клітинами були значно більші за розміром порівняно з контролем та показали зниження експресії CD69 – маркер активації Т-клітин та натуральних кіллерів (NK). Виходячи з цих висновків, очевидно, що дендритні клітини безпосередньо беруть участь та регулюють процес ангиогенезу, поряд із імунною активацією під час розвитку ендометріодних уражень [73, 74].

Ендометрій людини володіє унікальною здатністю проходити циклічну проліферацію функціонального шару після фізіологічного відторгнення ендометрія. Таким чином, фрагменти ендометрія з матки, які відокремлюються, зберігають ангиогенні функції в черевній порожнині. Постнатальна неоваскуляризація раніше вважалася можливою лише в обмежених випадках. Тепер очевидно, що при васкуляризації ендометріозу, в місці ураження відбуваються як ангиогенез, так і васкулогенез. Під регуляцією  $E_2$ , який збільшує експресію VEGF перитонеальних макрофагів, неоваскуляризація ендометріодних уражень схоже, що відбувається в основному з раніше існуючих судин перитонеальної мембран в процесі ангиогенезу. Повне з'ясування механізмів, що лежать в основі процесу ангиогенезу, залишається складним через інші імунні клітини та медіатори, які беруть участь у неоваскуляризації. Для порівняння, процес васкулогенезу здається більш лаконічним, як вказують дослідження, які ясно показали включення та підбір ЕКП кістково-мозкового походження до судинної мережі ендометріодних уражень. Знання механізмів утворення судинного русла сприятиме розвитку методів лікування, орієнтованих на абляцію вогнища ураження, яке може виявитися більш вигідним у порівнянні з існуючою в даний час гормональною терапією, яка використовується при лікуванні ендометріозу.

## 1.2 Методи консервативної терапії перитонеального ендометріозу

Ендометріоз визначається як наявність ендометріюїдних тканин за межами матки, що викликає хронічні запальні реакції [75]. Хоча частина жінок з ендометріозом може відчувати хворобливі симптоми і/або безпліддя, у решти немає ніяких симптомів взагалі.

Кілька досліджень вивчали симптоми та ознаки, пов'язані з ендометріозом, результатом яких є довгий список ендометріоз-асоційованих симптомів, включаючи дисменорею, хронічний тазовий біль, глибоку диспареунію, циклічні кишкові розлади, хронічна втома та безпліддя. Однак, ці дослідження мають ретроспективний дизайн і не вказують на прогностичне значення зазначених симптомів [8, 76-81].

Проведений один великий ретроспективний аналіз описаних симптомів, який дозволяє прогнозувати діагноз ендометріозу, у тому числі важка дисменорея у безплідних жінок, абдомінально-тазовий біль, дисменорея, рясні менструальні кровотечі, неплідність, диспареунія, посткоїтальні кровотечі та/або попередній діагноз кісти яєчника, синдром подразненого кишечника або запальні захворювання тазових органів [82].

### 1.2.1 Лікування болю, асоційованого з ендометріозом

Емпіричне лікування болю. Багато жінок, які страждають тазовим болем, маючи високу підозру на ендометріоз, використовують анальгетики і гормональні препарати без попереднього остаточного діагнозу за допомогою лапароскопії. Частково це пояснюється інвазивністю лапароскопії, проте також і легкістю виписування гормональних контрацептивів, які у будь-якому випадку призначають для попередження вагітності. Це емпіричне лікування особливо часто зустрічається у підлітків із тазовими болями та дисменореєю. Однак, перш ніж розпочинати емпіричне лікування, інші причини симптомів тазового болю слід розглянути та виключити. Якщо жінка не буде позитивно

реагувати на емпіричне лікування повинна проводитися лапароскопія для виключення або постановки діагнозу. Однак, реакція на гормональне лікування не завжди може вказувати на наявність або відсутність ендометріозу [83, 84].

Лікарям рекомендується призначати гормональне лікування (гормональні контрацептиви), прогестагени, анти-прогестагени або ГнРГ, як одну з опцій, так як це знижує ендометріоз-асоційований біль [85, 86].

Призначення комбінованих гормональних контрацептивів є доцільним, так як це знижує ендометріоз-асоційовану диспареунію, дисменорею та неменструальні болі [87]. Має розглядатися безперервне використання комбінованих оральних контрацептивів у жінок, що страждають ендометріоз-асоційованою дисменореєю [88].

Рекомендується використання прогестагенів, дієногесту, ципротерону ацетату, норетістерону ацетату (або даназолу) або анти-прогестагенів (гестрінон), як одна з опцій для зменшення ендометріоз-асоційованого болю [89].

Рекомендовано взяти до уваги різні профілі побічних дій прогестагенів та анти-прогестагенів при призначенні даних препаратів, особливо необоротні побічні ефекти (наприклад, тромбози і андрогенні побічні ефекти).

Клініцистам рекомендовано розглянути призначення левоноргестрел-релізинг внутрішньо-маткових систем, як один з варіантів, щоб зменшити ендометріоз-асоційований біль [90-93].

Агоністи ГнРГ, з або без додаткової терапії, є ефективними в купуванні ендометріоз-асоційованого болю, але можуть бути асоційовані з важкими побічними ефектами, які повинні бути обговорені з жінкою, коли пропонується лікування. Не існує доказовості ефективності антагоністів ГнРГ для менеджменту ендометріоз-асоційованого болю [86].

Клініцистам рекомендується використовувати агоністи ГнРГ (нафарелін, лейпролід, бусерелін, гoserелін або трипторелін), як один з варіантів зниження ендометріоз-асоційованого болю, хоча обмежені доказові дані щодо дози або



тривалості лікування [86]. Лікарям рекомендується призначати гормональну add-back терапію, яка повинна збігатися із терапією агоністами ГнРГ, для запобігання втрати кісткової маси та гіпоестрогенних симптомів під час лікування. Це не впливає на ефективність лікування стосовно полегшення болю [94-97].

Рекомендовано лікарям ретельно розглянути використання агоністів ГнРГ у молодих жінок і підлітків, оскільки ці пацієнтки не досягли максимальної щільності кісткової тканини.

У жінок з болем внаслідок ректовагінального ендометріозу, рефрактерного до іншого медикаментозного або хірургічного лікування, клініцисти можуть розглянути можливість призначення інгібіторів ароматази у поєднанні з прийомом комбінованих оральних контрацептивів, прогестагенів або агоністів ГнРГ, так як вони зменшують вираженість ендометріоз-асоційованого болю [98, 99]. З-за важких побічних ефектів, інгібітори ароматази повинні призначатися тільки після вичерпання інших варіантів медикаментозного або хірургічного лікування.

### 1.3 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз. Способи індукції у лабораторних тварин

Враховуючи, що на момент клінічних проявів, більшість жінок вже мають встановлений діагноз ендометріозу, навряд чи можна надати експериментальні докази в патогенезі даного захворювання у людей. Крім того, етичні міркування обмежують виконання контрольованих експериментів, і це не дозволяє контролювати прогресування захворювання, не виконуючи повторних лапароскопій. Таким чином, дослідження основних механізмів, за допомогою яких менструальний ендометрій прикріплюється, проникає та встановлює функціональну судинну мережу задля персистенції в позаматковій локалізації, а

також розробку нових терапевтичних підходів краще всього проводити на експериментальних моделях тварин.

Враховуючи, що менструальна десквамація є необхідною умовою для спонтанного розвитку даного захворювання, ендометріоз природно зустрічається тільки у людини та деяких інших приматів. Примати були широко використані для дослідження ендометріозу; проте, дуже високі витрати на придбання та утримання тварин обмежують використання мавп у якості експериментальної моделі. З цієї причини, використання дрібних лабораторних тварин, особливо гризунів, у якості моделей для ендометріозу шляхом трансплантації шматочків тканини ендометрія в ектопічних ділянках значно розширені в останні роки. Нижче розглядаються найбільш часто використовувані тваринні моделі та їх застосування для різних завдань.

### 1.3.1 Хоріоалантоїсна модель

Модель на хоріоалантоїсній мембрані курки може вважатися як тваринна модель у широкому сенсі. Первинно, вона була розроблена для вивчення інвазивних, метастатичних та ангіогенного потенціалів пухлинних клітин [100, 101]. Вона була створена як модель для ендометріозу при культивуванні фрагментів людських тканин ендометрія на базальний шар хоріоалантоїса фертилізованих курячих яєць після попереднього інкубування протягом 7-10 днів [102, 103]. Фрагменти ендометрія в проліферативній та секреторній фазі менструального циклу, а також менструальний ендометрій, проникають через епітелій мезенхімального шару та розвиваються у вигляді ендометріод-подібних уражень в цьому шарі хоріоалантоїса протягом трьох днів після пересадки людської тканини [41, 103, 104]. Було показано, що ці фрагменти ендометрія повинні містити неушкоджені залозисті структури, а також стромальні компоненти.

Ангіогенез може бути документально підтверджений вrostанням судин з боку хоріоалантоїса у фрагменти ендометрія людини [103]. Антиангіогенні

фактори, такі як ендостатин, TNP-470 та анти-VEGF антитіла, суттєво знижують ангіогенну відповідь до трансплантованого ендометрія [41]. Jeung та співавт. (2016) [105] показали, що перитонеальна рідина від жінок з ендометріозом індукує достовірно вищу ангіогенну відповідь в хоріоалантоїсі, аніж перитонеальна рідина від жінок без ендометріозу. Враховуючи, що хоріоалантоїс містить компоненти позаклітинного матриксу, аналогічною позаклітинному матриксу людської очеревини [106], він може бути використаний для дослідження інвазивного потенціалу ендометріюїдних тканин. Nap та співавт. (2004) [104] продемонстрували, що профілі експресії ММП були аналогічними в експериментально індукованому ендометріозі у хоріоалантоїсі порівняно із людським ендометріозом, і що розвиток ранніх ендометріюїдних уражень у хоріоалантоїсі може бути попереджений блокуванням активності ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-7 та ММП-13. Згідно з Wolber та співавт. (2003) [107] незначні концентрації мРНК МПП-1, проте не мРНК МПП-2, підвищуються значно після культивування ендометрія в хоріоалантоїсі.

Модель на хоріоалантоїсі добре підходить для дослідження механізмів, що беруть участь в інвазії та ангіогенезі на початку встановлення вогнища ендометріозу, наприклад, пригніченням факторів, які беруть участь у цих процесах. Ектопічне ураження легко доступне і можна легко провести спостереження під час експерименту. Ця модель ендометріозу навряд чи може бути застосована для вивчення імунологічних або запальних реакцій або для аналізу довгострокових ефектів препаратів на перебіг захворювання.

### 1.3.2 Моделі на гризунах

На відміну від людини та інших приматів, у естральних тварин ендометрій не десквамується, а отже, спонтанний розвиток ендометріозу неможливий. Втім, ендометріоз може бути викликаний шляхом пересадки ендометріальних тканин в ектопічні локалізації. Ці моделі поділяються на два

типи: гомологічні та гетерологічні. Гомологічні моделі можливо отримати за допомогою хірургічної трансплантації ендометрія з тієї ж або сингенної тварини в імуннокомпетентні тварини, тоді як гетерологічні моделі отримують за допомоги пересадки ендометрія людини внутрішньоочеревинно або підшкірно, зазвичай, імунодефіцитним мишам.

#### Ауто трансплантація ендометрія в імуннокомпетентні миші та щурі.

Ауто трансплантація тканин матки в ектопічні ділянки дрібних лабораторних тварин виконано не тільки у щурів [108-112] і мишей [113-115], але й у хом'яків [116] та кроликів [117-120]. Ці моделі на приматах, в основному щурачі та мишачі моделі, отримали подальший розвиток в останні роки. У цих моделях ендометріозу матку видаляють та подрібнюють на дрібні шматочки, які потім, в основному шляхом накладення швів, фіксуються в очеревинній порожнині. У більшості цих досліджень ендометрій не відділений від міометрію; таким чином, обидва шари імплантуються [110, 113]. У щурів тканини матки розвиваються в кістозні структури овоїдної форми, заповнені рідиною, які складаються з міометральної та ендометріальної тканин. Кісти ростуть у розмірах, проте стабілізують свій розмір через 3-4 тижні та зберігають життєздатність протягом не менше 10 місяців [110].

У мишей ектопічні фрагменти матки показують гістологічні характеристики захворювання людини, в тому числі формування множинних, високоваскуляризованих уражень, які містять залози ендометрія, строму та кісти, незалежно від їх перитонеальної локалізації в очеревинній порожнині [113]. Лише у обмеженій кількості дослідів на щурах [121] та мишах [114, 122, 123] розділяли ендометрій від міометрію, фіксуючи тільки ендометрій до ектопічних ділянок. У дослідженні Somigliana та співавт. (1999) [114], ізольована ендометріальна тканина була подрібнена та уведена повторно в очеревинну порожнину реципієнта – сингенній тварині. Як донорам, так і реципієнтним мишам було виконано оварієктомію та проведено замісне естрогенне лікування. В даному дослідженні у всіх реципієнтів виявлені докази

перитонеального ендометріозу через 2,5-3 тижні, а неоваскуляризація спостерігалася на поверхні вогнищ ураження. Однак, кількість утворених уражень складало в середньому 30% від уведених фрагментів ендометрія.

Для більш точного визначення розмірів і локалізації ектопічних вогнищ ендометріозу після трансплантації, Hirata та співавт. (2005) [122] розробили гомологічну мишачу модель із використанням «зелених мишей», які містять зелений флуоресцентний білок (GFP), в якості донорів та пересаджували флуоресцентні тканини ендометрія у миші-реципієнти. Було показано, що вага вогнищ ендометріозу достовірно корелює із виміряною інтенсивністю флуоресценції. Ця флуоресценція була значно вища у мишей, що отримували естрогенну терапію, у порівнянні із контрольними тваринами, підтримуючи естроген-залежність даних ектопічних ендометріальних уражень.

Ендометріоз, як відомо, є естрогензалежним захворюванням у жінок, та зменшення рівня сироваткового естрогену підтримує регрес цих ектопічних вогнищ [124, 125]. Аутоотрансплантовані тканини матки у моделі на гризунах показують стероїдну залежність, і таким чином, дана модель широко використовується для визначення відповіді ектопічних вогнищ на стероїдні гормони, а також на препарати, які взаємодіють із дією даних гормонів. Відповідно до стану речей у людини зростання ектопічної ендометріальної тканини в обох моделях на гризунах (на щурах та на мишах) є естроген-залежною [110, 111, 115]. У щурів, яким було виконано оварієктомію через 3 тижня після імплантації тканин матки, позаматкові фрагменти розвивалися набагато краще у тварин, які отримували тільки естрогени, аніж при поєднанні естрогенів та прогестерону [126, 127], що підтверджує важливу роль естрогенів у якості фактора, що визначає розмір імплантів і водночас показує антипроліферативну дію прогестерону.

Згідно із клінічною ситуацією у жінок регрес маткових імплантів може бути викликаний у гризунів шляхом створення гіпоестрогенного стану, наприклад, шляхом оварієктомії [128], шляхом застосування ГнРГ агоністів

[128-130], шляхом застосування синтетичних прогестагенподібних речовин, таких як левоноргестрел або дієногест [109, 121], або за допомогою лікування даназолом [131]. Відповідних ефектів можна досягти в даній моделі за рахунок зниження концентрації естрогенів при застосування антиестрогенів [129], при застосуванні селективного модулятора рецептора естрогену ралоксифену [123] або при застосуванні інгібіторів ароматази, які перешкоджають синтезу естрогенів [128, 132]. Окрім того, аутологічна модель на щурах, зокрема, активно використовувалася в дослідженнях імуномодулюючих препаратів та протизапальних засобів при ендометріозі. Uchiide та співавт. (2002) [133] показали, що аутотрансплантація матки у щурів індукує інфільтрацію клітинами, які пов'язані з алергічною реакцією, у перитонеальну строму, яка прикріплена до ектопічної тканини матки. Імуномодуляція при внутрішньоочеревинному або підшкірному веденні інтерферону- $\alpha$ -2b у щурів зменшила розмір уражень, як було показано послідовними лапаротоміями за період до 4 місяців [134], так само як і застосування імуномодулятора локсорібін у щурів [135] та інтра-перитонеальна ін'єкція IL-12 у моделі на мишах [114].

Крім того, ця модель на гризунах дає можливість дослідити вплив забруднюючих речовин на утворення ектопічних імплантів матки. Показано, що діоксин, після попередньої хірургічної індукції ендометріозу, викликає дозозалежне збільшення діаметру ендометріоїдного вогнища у щурів та мишей [136].

Нещодавно цікавий підхід був описаний Dinulescu та співавт. (2005) [137] для отримання моделі ендометріозу на мишах de-novo. Активація онкогена K-ras на поверхні епітеліальних клітин яєчників, проте не у клітинах перитонеальної вистилки, призвели до розвитку доброякісних уражень з гістоморфологічними особливостями людського ендометріозу. В доповнення до розвитку уражень яєчників, майже у половині мишей також розвивався перитонеальний ендометріоз через 8 місяців після активації K-ras на поверхні

епітеліальних клітин яєчників. У поєднанні з умовною делецією *Pten*, який був залучений в прогресуванні ендометріозу яєчників в ендометрію карциному яєчника людини [138], експресія *K-ras* навіть індукує метастатичну ендометрію аденокарциному яєчників. Однак, на сьогоднішній день не були знайдені мутації *K-ras* при ендометріозі у людини [139, 140].

Відмінною рисою симптомів ендометріозу у жінок є наявність вираженого тазового болю та істотно зменшена фертильність [141]. Вплив ектопічних вогнищ на фертильність вивчено в лабораторних гризунів. Хоча *Bilotas, Olivares* та співавт. (2015) [142] не виявили зниження фертильності у мишей, зниження плодючості спостерігалось у щурів із штучно викликаним ендометріозом [110], що може бути частково пояснено збільшенням кількості лютеїнізованих нерозірваних фолікулів яєчників [143]. Окрім цього, роль злук в малому тазу не виключено. Більше того, гіперактивація перитонеальних клітин запалення може вплинути на фертильність при ендометріозі. Це було підтримано в роботі *Torres-Reverón* та співавт. (2020) [144], де продемонстровано, що макрофаг-опосередкований субфертилітет у моделі на мишах може бути компенсований за допомогою пентоксифіліну, препарат, який змінює ефект гіперактивації макрофагів, а також те, що медикаментозне інгібування активації макрофагів покращує фертильність у моделі ендометріозу на хом'яках [116].

Нещодавно були опубліковані дані досліджень по вивченню впливу ектопічних ендометріюдних вогнищ на біль у моделі ендометріозу на щурах. Виявлено, що аутоотрансплантовані позаматкові кістозні фрагменти ендометрія можуть розвивати свою власну інервацію, включаючи симпатичні еферентні, а також сенсорні волокна [145], що може мати загальний вплив на нервову систему. Це підтверджується висновком про те, що збільшувався вагінальний біль (ноціцепція) у щурів з ендометріальними кістами, аналогічно із ситуацією у жінок з ендометріозом. Крім того, у даних щурів виявляли вагінальну гіперальгезію [146] – один зі симптомів тазового болю у жінок. Автор

припустив, що нейроактивні агенти, які містяться в ендометріюїдних кістах, можуть активувати ноцицептивні аферентні волокна, які в свою чергу впливають на центральні механізми нервової системи, пов'язані з вагінальним болем, а також через вісцero-вісцеральну взаємодію [145, 147]. Залишається з'ясувати чи будуть щури проявляти інші симптоми хронічного тазового болю, окрім вагінальної гіперальгезії.

Існують суттєві відмінності між репродуктивною фізіологією гризунів та людини, а отже ці моделі мають обмеження. Адже гризуни не менструюють, вони не можуть розвивати спонтанний ендометріоз, і захворювання повинно бути викликано штучно шляхом аутоотрансплантації тканин матки. Крім того, у більшості досліджень, фрагменти матки були пересажені разом із міометральним шаром, що може вплинути на розвиток уражень. При оцінці ваги та розміру уражень міометрії може скласти значну частку, що не відображає ситуацію ендометріюїдних уражень у людини.

Незважаючи на ці обмеження, модель на гризунах має значні переваги. Окрім незначних витрат та можливість проводити дослідження у великих групах генетично подібних тварин, довгострокові дослідження можуть бути виконані, так як немає відторгнення аутоотрансплантованої ектопічної тканини. Дана модель добре підходить для дослідження механізмів, що беруть участь в прикріпленні ендометріальних клітин до очеревини, а також терапевтичних ефектів препаратів та хімічних речовин, і це дозволяє оцінити ектопічні вогнища у різний час після застосування. Більше того, гомологічні моделі на гризунах з хірургічно викликаним ендометріозом не впливають на імунну систему і, таким чином, можуть бути використані для вивчення впливу імуномодулюючих та протизапальних засобів на ендометріоз. Крім того, зважаючи на нові відкриття в етіології ендометріозу, які були отримані за допомогою геномних та протеомних підходів, трансгенні миші можуть набувати значення, як моделі ендометріозу для вивчення функцій, обумовленими одиночними генами.



Ксенотрансплантація людського ендометрія імунодефіцитним мишам.

Зважаючи на те, що причинні фактори розвитку і підтримки ендометріозу можуть локалізуватися в самому ендометрії, і можуть бути відсутніми в ендометрії гризунів, були розроблені моделі за допомогою імплантації тканин ендометрія людини замість аутологічного ендометрія на імунодефіцитних штаммах мишей. Найбільш часто використовують для цієї мети атимічні голі миші з дефіцитом зрілих Т-лімфоцитів. Фрагменти людського ендометрія проліферативної або секреторної фази менструального циклу [148-154], а також менструального ендометрія [152, 155, 156], були успішно імплантована підшкірно або внутрішньоочеревинно у голих, Т-клітинно-дефіцитних мишей. Ці фрагменти імплантуються та формують ендометріюїдподібні ураження, що нагадують ті, які знаходять у пацієнтів за макроскопічним та гістологічним виглядом, та, схоже, час забору тканини людини не впливає на розвиток цих ектопічних вогнищ [152]. Збереження рецепторів до естрогенів та прогестерону та реагування на стероїди було продемонстровано в ектопічній тканині людини [148, 151, 153]. Ангіогенез є гарантією збереження та розвитку імпланту та транспортування системно застосованих препаратів до тканини ендометрія людини. Утворення судин мишачого походження розпочинається від 4-го дня після трансплантації і далі, незалежно від локалізації ектопічних вогнищ [153, 157].

Зважаючи на те, що в мишачій гетерологічній моделі, людські тканини пересаджені, терміни технічної обробки інтактною та добре збереженою тканини є лімітованими. У більшості проведених досліджень існування культури ендометрія людини у голих мишей не перевищувало 4 тижня. Починаючи з трьох тижнів після щеплення і далі може спостерігатися дедиференціація ендометрія та інфільтрація лімфоцитами [153].

Більш тривале утримання тканин людини у даній тваринній моделі може мати певні переваги для спеціальних експериментальних підходів. Зважаючи на це, миші з більш дефектною імунною системою були використані для

гетерологічної моделі ендометріозу. Тканини людського ендометрія були успішно трансплантовані мишам із важким комбінованим імунodefіцитом (SCID) [158-160], а також діабетичним мишам з імунodefіцитом, що не страждають ожирінням (NOD-SCID) [153]; у обох типів мишей існує комбінований вроджений дефіцит функції Т- та В-лімфоцитів. Порівняно з моделлю на голих мишах, ендометрій людини пересаджений SCID та NOD-SCID мишам показав вищу виживаність фрагментів [158] та краще збереження морфології та експресії рецепторів до стероїдних гормонів протягом 4-ох тижнів [153].

Тваринні моделі ендометріозу, які базуються на ксенотрансплантації людського ендометрія, дозволяють виявити механізми, які беруть участь у утворенні ендометріозу, а також вивчення ефектів потенційних терапевтичних речовин на тканини людини. Один з підходів для запобігання розвитку перитонеального ендометріозу може бути орієнтований на адгезію тканин ендометрія та інвазію клітинного шару очеревини. ММП беруть участь в таких процесах інвазії [161, 162]. Було показано, що ММП регулюються за допомогою стероїдних гормонів та цитокінами у тканині ендометрія, та супресія ММП гальмує утворення нових ектопічних вогнищ ендометрія людини у голих мишей [151, 163].

Ще однією терапевтичною ціллю, яка розглядається, є дія на розвиток нових кровоносних судин. Було показано, що ендометріальні ксенотрансплантанти у голих мишей продукують високі рівні VEGF [152] та анти-ангіогенні агенти, такі як розчинні рецептори VEGF (sflt-1) та антитіла до VEGF-A суттєво пригнічують ріст ендометріюідних вогнищ у голих мишей [157].

Зважаючи на те, що ендометріоз є естрогензалежним захворюванням, здатність ектопічних вогнищ реагувати на стероїдні гормони була досліджена на даній моделі. Попередня обробка клітин ендометрія людини тільки естрогенами або в комбінації із прогестинами, проте не окремо прогестинами,

перед ін'єкцією в перитонеальну порожнину голих мишей призвела до збільшення частки тварин, у яких розвивалися ураження [154]. Використовуючи візуалізацію *in vivo*, Ferrero та співавт. (2017) [164] продемонстрували значне зменшення площі ураження у голих оваріектомізованих мишей, яким не вводився естроген на відміну від тих, кому вводилося естроген.

На відміну від гомологічних моделей на гризунах, миші, що використовуються в гетерологічній моделі, мають дефіцит імунної системи, і, отже, практично не використовуються в дослідженнях, що оцінюють вплив імуномодуючих препаратів. Застосування інгібітора ЦОГ-2, який, як відомо, є регулятором в місцях запалення, не має впливу на кількість та/або розмір ектопічних ендометріальних уражень у голих мишей [165]. Однак, протизапальні компоненти, що містяться, наприклад, в перитонеальній рідині жінок, можуть бути вивчені за допомогою даної моделі. Tabibzadeh та співавт. (1999) [166] продемонстрували, що клітини ендометрія, зважені у перитонеальній рідині жінок без ендометріозу, утворюють значно менше ектопічних уражень чим ті, які зважені у перитонеальній рідині жінок з ендометріозом при внутрішньоочеревинному введенні голим мишам.

Ця модель поділяє переваги, описані для гомологічної моделі, такі як легка доступність та відносно низька вартість, а також деякі обмеження, такі як відмінності у репродуктивній фізіології гризунів та людини. Однак, ця модель із пошкодженою імунною системою. Однак, мишача гетерологічна модель ендометріозу являє собою перспективний інструмент для експериментальних підходів оцінки етіології цього захворювання та терапевтичних випробувань фармакологічних та гормональних модуляторів, так як заснована на людському ендометрії. Для даних досліджень тканин людського ендометрія можуть бути вилучені у жінок із ендометріозом та без ендометріозу, а також з ендометріоїдних вогнищ. Механізми регулювання, наприклад, після введення препарату, можуть бути оцінені у людській ектопічній тканині в ситуації *in vivo*.

Нещодавно апробовані методики з використанням флюоресценції дозволяють отримати прижиттєві зображення та можуть поліпшити кількісну оцінку та розміри ектопічних уражень.

### 1.3.3 Моделі на приматах

Менструючі примати можуть розвивати спонтанний ендометріоз, утворюючи ектопічні ураження, які гістологічно та по розташуванню аналогічні до людських [167-169]. Спонтанний ендометріоз не розвивається з високою частотою в усіх мавпах, що може бути пов'язано з різною частотою вагітностей, що призводить до більшої або меншої кількості менструальних циклів поспіль зі збільшенням або зменшенням експозиції до ретроградної менструації [170]. Хоча спонтанний ендометріоз був описаний у 11 видів приматів [171], більшість досліджень були виконані на резус-макаках та павіанах.

Враховуючи, що спонтанно ендометріоз у мавп розвивається повільно протягом періоду декількох років, були розроблені методи для штучної індукції цього захворювання. У перших дослідженнях менструальну кров було перенаправлено в черевну порожнину шляхом репозиціонування шийки матки у резус-макак [172], а пізніше шляхом перекриття шийки матки задля збільшення обсягу ретроградної менструації у павіанів [173]. Крім того, хірургічна індукція захворювання може бути виконана шляхом ушивання фрагментів тканин ендометрія в ектопічних ділянках або шляхом уведення в очеревинну порожнину фрагментів тканин ендометрія [174-176]. Куама та співавт. (2014) [174] індукували ендометріоз у павіанів шляхом внутрішньоочеревинного введення тканини ендометрія, демонструючи, що ендометріоз розвивався подібно до спонтанних випадків, а також те, що ектопічні вогнища індукуються більш ефективно при щепленні менструального ендометрія у порівнянні з ендометрієм лютеїнової фази. Хоча в даному дослідженні ендометрій з менструальної крові був отриманий від кожного

павіана шляхом кюретажу, і таким чином містить ендометріальні шари клітин, які фізіологічно не десквамуються під час менструації, інші дослідження використовували десквамований менструальний ендометрій [177, 178].

Що стосується впливу ендометріозу на фертильність приматів, було доведено, що помірний або важкий ендометріоз призводить до зниження частоти настання вагітності у павіанів [179], а також до скорочення кількості вагітностей в строк у іншого виду мавп, *Macaca fascicularis* [180]. Чи існують ці ефекти на репродуктивну функцію з-за злукового процесу та/або імунологічних реакцій ще належить вивчити. Крім того обговорюється вплив зворотного зв'язку вогнищ ендометріозу на еутопічний ендометрій, і ще належить визначити чи відмінності в фертильності призводять до ендометріозу або є результатом ендометріозу. Чи наявність ектопічних імплантів в очеревині впливає на фізіологію еутопічного ендометрія може бути вивчено саме на приматах. Збільшення ангиогенних факторів Cyp61, які, як відомо, deregulовані в ендометрії жінок з ендометріозом [181], можуть бути знайдені в еутопічному ендометрії павіанів після інокуляції менструального ендометрія [182]. Це дослідження свідчить на користь механізму зворотного зв'язку від ендометріодних уражень, що викликає зрушення в характері експресії генів у еутопічному ендометрії павіанів.

Немає сумнівів, що модель ендометріозу на приматах є найбільш близькою до ситуації в організмі людини і тому є найбільш придатною для вивчення численних аспектів цього захворювання, в тому числі ініціювання та прогресування ендометріозу, імунологічні параметри, спадковість, а також механізми зворотного зв'язку з еутопічним ендометрієм. Дана модель має багато спільного з жінками з урахуванням анатомії органів малого тазу, репродуктивної фізіологічної характеристики та імунологічних особливостей. У приматів може бути спонтанний розвиток ендометріозу, а також дане захворювання може бути індуковане для дослідницьких цілей. Вони являють собою єдину експериментальну модель, яка дозволяє порівняння параметрів

спонтанного ендометріозу з параметрами до та після індукції захворювання, і, таким чином, отримати інформацію про причини та наслідки хвороби. Однак етичні міркування і, зокрема, висока вартість проведення даних дослідів з приматами обмежує використання цієї моделі в дослідженні ендометріозу.

#### 1.4 Блокування ангіогенезу, як можливий метод лікування перитонеального ендометріозу

##### 1.4.1 VEGF-опосередкований ангіогенез та його інгібітори

Судинно-ендотеліальний фактор росту (VEGF), також відомий як VEGF-A, є секреторним цитокином, структурно пов'язаний із тромбоцитарним фактором росту (PDGF), що сприяє фізіологічному та пухлинному ангіогенезу [183-186]. У мишей, повне пошкодження даного фактору є летальним і викликає важкі серцево-судинні відхилення [187, 188]. VEGF має мітогенний ефект на ендотеліальні клітини. *In vitro*, він сприяє проліферації, міграції та формуванню трубки з ендотеліальних клітин [189]. У різноманітних *in vivo* моделях він індукує сильну ангіогенну відповідь [190]. У зрілому віці, VEGF бере участь у загоєнні ран, при менструації, вагітності та для підтримки артеріального тиску [186]. Також преєклампсія асоціюється із високим рівнем циркулюючих VEGF рецепторів типу 1 (sVEGFR-1) та ендогенних інгібіторів VEGF [191, 192]. У тваринних моделях було показано, що VEGF грає роль у гемостазі в клубочках нирок [193]. Нейтралізація фізіологічних рівнів розчинного VEGF рецептору за допомогою нейтралізуючих антитіл призводить до пошкодження гломерулярних ендотеліальних клітин і пошкодження подоцитів та протеїнурії. Він бере участь у ряді патологічних процесів, таких як псоріаз, діабетична ретинопатія, ендометріоз, ревматоїдний артрит та дегенерація жовтої плями [190]. VEGF зв'язує VEGFR-1 та VEGFR-2 рецептори, нейропідлін 1 та 2, гепарин сульфат та гепарин. Його здатність зв'язуватися із гепарином регулює його біологічні функції [194]. Під час фізіологічного ангіогенезу, його

виробляють різні типи клітин, включаючи нейтрофіли, тромбоцити та макрофаги [186].

Гени VEGF зазнають альтернативний сплайсинг для виробництва кількох ізоформ, які відрізняються кількістю амінокислот, здатністю зв'язувати гепарин і біоактивністю: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> та VEGF<sub>206</sub>[185, 195, 196]. Дещо рідше експресовані варіанти VEGF<sub>145</sub> [197] та VEGF<sub>183</sub> [198] також були визначені. VEGF<sub>121</sub> вільно виділяється і не зв'язує гепарин. VEGF<sub>189</sub> та VEGF<sub>206</sub> є базовими та легко зв'язують гепарин. До того ж, обидва майже повністю секвестровані позаклітинним матриксом і повинні бути розщеплені протеазами, щоб стати біологічно активними. VEGF<sub>165</sub> є переважною ізоформою VEGF, вільно виділяється, проте також прив'язана до поверхні клітин та позаклітинного матриксу [199]. Більшість досліджень, які націлені на VEGF спрямовані проти VEGF<sub>165</sub>.

VEGFR-1 модулює сигналювання VEGFR-2 при формуванні кровоносних судин в ембріогенезі [200]. В ембріональних стовбурових клітинах блокування VEGFR-1 без переривання сигнальної функції VEGFR-2 призводить до аномальної проліферації ендотеліальних клітин, які можуть бути компенсовані за допомогою інгібітора тирозинкінази, таргетованого проти VEGFR-2 [200].

Наразі існують наступні шляхи інгібування VEGF: 1) нейтралізуючі моноклональні антитіла проти VEGF та VEGFR; 2) дрібно-молекулярні інгібітори тирозинкінази VEGF-рецептору; 3) розчинні VEGF рецептори (VEGF-Trap) та 4) рибозими [201]. Окрім даних шляхів інгібування VEGF, які широко дискутуються в клінічній онкології, існують дані про можливість інгібування ангіогенезу, який був індукований VEGF, за допомогою нейротрансмітера дофаміну [202]. Васіс та співавт. (1991) [203] повідомляють, що дофамінергічні рецептори мають зв'язок із аденілатциклазою у ендотелії мозкових мікросудин людини. Дофамін – це катехоламічний нейротрансмітер, який залучений в патогенезі як хвороби Паркінсона, так і в розвитку шизофренії [204-207]. Дофамін та його похідні молекули показали інгібуючий

потенціал при кількох типах злоякісних пухлин у мишей, а його ефекти були пояснені гальмуванням проліферації клітин пухлини, стимуляцією імунітету та ін. [208-211]. Актуальні дослідження демонструють наявність D2 дофамінових рецепторів на ендотеліальних клітинах [212, 213], що може впливати на ангиогенез. Саме цей механізм цілком ймовірно є важливим в інгібуванні туморогенезу [214, 215], так як VEGF є найважливішим ангиогенним цитокіном при пухлинах та при інших типах патологічного ангиогенезу.

Вважається, що VEGF індукує ангиогенез шляхом залучення VEGF-рецептора типу 2 (VEGFR-2 або KDR чи Flk-1), що призводить до його фосфорилування та ряду нисхідних сигнальних подій [216]. Було виявлено, що 1  $\mu\text{M}$  дофаміну сильно гальмує VEGF-індуковане фосфорилування VEGFR-2 *in vitro*. D2 агоністи бромкриптин та квінпірол аналогічним чином інгібують VEGF-індуковане фосфорилування VEGFR-2 [217-219]. Також показано, що дофамін стимулює інтерналізацію поверхні VEGFR-2, імовірно шляхом ендоцитозу, залишаючи менше VEGFR-2 на поверхні для взаємодії з VEGF [217-219]. Таким чином, інгібуюча дія дофаміну на VEGF-індукований ангиогенез пояснюється його дією на етапі ранньої сигналізації. Важливо зазначити, що дофамін інгібує ангиогенез опосередкований VEGF, проте на опосередкований іншими механізмами ймовірно не впливає [219].

VEGF – це фактори росту цистинових вузлів, які специфічні для ендотелію судин, оскільки вони зв'язуються з рецепторами, які знаходяться лише в ендотеліальних клітинах. VEGF виступає в ролі головного ангиогенного фактору у нормальних та патологічних умовах. VEGF активує специфічні рецептори тирозинкінази рецепторів VEGFR-1, VEGFR-2 та VEGFR-3. VEGFA, VEGFB і PLGF зв'язуються і функціонують через VEGFR-1. VEGFR-2 зв'язує VEGFA дуже специфічним чином, але він також може зв'язувати рецептори VEGFC і VEGFD. VEGFC і -D діють через VEGFR-2 і -3. Notch сигналізація – це взаємодіючий шлях, який задіяний у функціонуванні VEGF та індукції



ангіогенезу. VEGF здатний індукувати експресію Notch1 та Delta4 ліганду Notch в клітинах ендотелію людини [220].

Було висловлено припущення, що сфінгозин 1-фосфат (S1P) взаємодіє з сигнальною системою VEGF. S1P, який виділяється тромбоцитами, індукує міграцію та проліферацію ендотеліальних клітин, викликаючи цитоскелетні зміни в цих клітинах. S1P зв'язує рецептори, пов'язані з G-білком (GPCR), з сімейства генів диференціації ендотелію (EDG). S1P здатний безпосередньо активувати VEGFR та активувати сигнальну систему PI3K / Akt або протеїнкінази B. Індукована S1P міграція клітин і передача сигналів через Akt інгібуються, коли VEGFR-2 інгібується, що говорить про тісну взаємодію між S1P і VEGFR-2. Дезінтегрин та металопротеїнази в ендотеліальних клітинах індукують диференціювання ендотеліальних клітин, а також індукують утворення капілярних структур та неоваскуляризацію [221, 222].

#### 1.4.2 ЦОГ-2/ПГЕ2-опосередкований ангіогенез та його інгібітори

VEGF не є єдиним шляхом активації ангіогенезу. Існують альтернативні шляхи активації, такі як через ЦОГ-2. ЦОГ-2 перетворює арахідонову кислоту в простагландин H<sub>2</sub>, який може бути ферментативно перетворений у п'ять основних простаноїдів: простагландин E<sub>2</sub>, простагландин D<sub>2</sub>, простагландин I<sub>2</sub> (простациклін), простагландин F<sub>2a</sub> та тромбоксан. Раніше було показано, що ЦОГ-2 та простагландин E<sub>2</sub> індукують ангіогенез у ряді систем, проте більшість досліджень вказують на непрямую роль за допомогою стимуляції інших проангіогенних факторів росту [223]. Окрім непрямого впливу, гіпотетично, ЦОГ-2/ПГЕ2 шлях може відігравати безпосередню роль у стимулюванні ангіогенезу через VEGF-незалежні паракринні механізми, які впливають безпосередньо на ендотеліальні клітини [224]. Дослідження показали, що ЦОГ-2 регулює VEGF-індукований ангіогенез, а також те, що VEGF контролює ЦОГ-2-індукований ангіогенез, вказуючи на реципрокність між цими шляхами [220, 225]. Здатність ЦОГ-2/ПГ E<sub>2</sub> шляху викликати VEGF-

незалежний ангіогенез, наводить на думку, що цей шлях може сприяти ангіогенезу коли VEGF-шлях заблокований. Однак, Xu та співавт. (2015) [226] показали, що бевацізумаб (bevacizumab, прямий, специфічний блокатор VEGF) у поєднанні з іСОХ мають помітну меншу ефективність ніж при окремому застосуванні. В той же час, при окремому застосуванні, іСОХ показав меншу ефективність стосовно блокування ангіогенезу у пухлинах, аніж бевацізумаб. У цьому ж дослідженні автори показали, що фосфорилування VEGFR2 *in vivo* у тканинах пухлини ефективно блокується інгібітором VEGF, в той же час як інгібітор ЦОГ-2 не впливав на фосфорилування [226].

Також, в літературі існують відомості про пригнічення VEGF-індукованої фосфорилування рецептору VEGF типу 2 за допомогою дофаміну [227-229], яке відбувається за рахунок фосфорилування тирозин-фосфатази 2 [230], а відтак, її інактивації.

Отже, зважаючи на сучасні уявленні щодо механізмів розвитку та патогенезу ендометріозу, роль ангіогенезу в становленні та розвитку уражень, зважаючи на імунну дисфункцію, яка ймовірно призводить до переважання ангіогенних факторів локально в місцях імплантації фрагментів еутопічного ендометрія, а також на роль VEGF-опосередкованого ангіогенезу, доцільним є пошук шляхів пригнічення або неповного блокування даної біологічно активної структури (VEGF). В сучасній літературі, зокрема онкологічного напрямлення, розглядаються різні за механізмом дії речовини, здатні пригнічувати VEGF або VEGFR. Серед них, окрім спеціальних хімічних агентів, які наразі перебувають на доклінічних стадіях дослідження, чільне місце займають агоністи дофамінових рецепторів, які, як було показано, також впливають негативно на фосфорилування VEGF-рецептора типу 2, а відтак, інактивують його.

В той же час, визначено, що існують й інші, альтернативні шляхи активації ангіогенезу, як-то ЦОГ-2/ПГЕ2. За даними деяких джерел, між VEGF-опосередкованим механізмом та ЦОГ-2/ПГЕ2 механізмом існує взаємна кросс-

регуляція. ЦОГ-2 механізм ймовірно також діє опосередковано через VEGF та VEGFR.

Зважаючи на вищезазначене, значний науковий інтерес стосовно можливості пригнічення розвитку ендометріозу представляють вказані класи речовин, а саме: агоністи дофамінових рецепторів та високоселективні інгібітори ЦОГ-2.

#### 1.4.3 Роль матричних металопротеїназ при ендометріозі

Матричні металопротеїнази (MMP) – це сімейство ендопептидаз, які відіграють певну роль у деградації та змінах позаклітинного матриксу. Ці ферменти, що є цинк-залежними, до складу яких входять колагенази, желатинази та стромелізини, здатні руйнувати всі компоненти позаклітинного матриксу. Тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMP), які впливають на нормальне та патологічне ремоделювання матриці, регулюють активність матричних металопротеїназ [231, 232]. Вважається, що матриксні металопротеїнази можуть наділити ендометріальні клітини здатністю інвазії в перитонеальний позаклітинний каркас та базальну мембрану. Також добре відомо, що ремоделювання ендометрія та експресія матричних металопротеїназ відбувається під час проліферативної та менструальної фаз менструального циклу, і що прогестерон є сильним пригнічувачем матричних металопротеїназ [18]. Продукування матричних металопротеїназ та їх інгібіторів відбувається в стромі та епітелії ендометрія, а також у поліморфних одноядерних лейкоцитах. Іншим важливим джерелом даних ферментів є макрофаги, нейтрофіли та еозинофіли, активізовані як наслідок запального стану низького ступеня, що має місце в перитонеальній порожнині жінок з ендометріозом [233-235]. Невідомо, чи пов'язані концентрації цих ферментів лише з лапароскопічно видимими ендометріоїдними ураженнями, чи вони також змінені у пацієнтів з болем та/або безпліддям без чітко вираженого ендометріозу.

На основі специфічності субстрату, схожості секвенцій генів та організації доменів, матриксні металопротеїнази, які виробляються хребетними істотами можуть бути розділені на 6 груп, такі як колагенази, желатинази, стромелізени, матрилізени, матричні металопротеїнази мембранного типу та інші. В нормальних фізіологічних умовах, активність матричних металопротеїназ (ММР) точно регулюється на рівні транскрипції, взаємодії зі специфічними позаклітинними матричними компонентами та інгібуванням ендogenousними інгібіторами.

Желатинази, включаючи ММР-2 (желатиназа А) та ММР-9 (желатиназа В) в подальшому розрізняють за інсерціями трьох повторень багатих цистеїном, які знаходяться в каталітичному домені. Ці вставки нагадують повтори фібрoneктину в колагені II типу і необхідні для зв'язування та розщеплення колагену та еластину [236, 237]. ММР-9 найбільший та найскладніший член сім'ї металопротеїназ, який бере участь у реконструкції компонентів позаклітинного матриксу при різних фізіологічних та патологічних процесах, такі як ембріональний розвиток та ангиогенез. У ММР-9-дефіцитних лабораторних мишах було виявлено зниження фертильності та імунна дисфункція [238, 239]. Виходячи з вищевикладеного, підвищена експресія ММР-9 та, ймовірно, ММР-2 може бути асоційовано з ендометріозом та його тяжкістю [240, 241].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконували відповідно до положень Конвенції ради Європи про права людини та біомедицину, основних положень ICH, GCP (1996 р.), Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2000 р.), Гельсінської декларації «Рекомендації для лікарів із проведення біомедичних досліджень із залученням людини» (1964 р.), рекомендацій Комітету з біоетики при Президії АНМ України (2002 р.), наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р. "Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань та Типового положення про комісії з питань етики", з урахуванням змін внесених наказом МОЗ України № 304 від 06.05.2014 а також внесених змін Європейського Парламенту та Ради ЄС від 16 квітня 2014р. (Постанова ЄС №536/2014) щодо клінічних випробувань лікарських засобів для людини. При виконанні роботи керувалися загальними положеннями про порядок проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань відповідно до статей 7 та 8 Закону України «Про лікарські засоби» з урахуванням вимог Директиви 2001/20/ЄС Європейського Парламенту та Ради ЄС.

Формуляр інформованої згоди та карта обстеження пацієнта схвалені комісією з питань біомедичної етики Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет" (БДМУ) МОЗ України (м. Чернівці). Це передбачало дотримання концепції інформованої згоди, з урахуванням переваг користі над ризиком шкоди, принципу конфіденційності та поваги до особистості пацієнта за його особистим підписом.

## 2.1 Характеристика експериментальних досліджувальних груп

В експерименті прийняли участь 83 статевозрілих нелінійних білих щурів жіночої статі масою 170-200 г, які ще не народжували, віком 14-17 тижнів.

Усі маніпуляції з тваринами виконано згідно рекомендацій Міжурядового комітету з біоетики UNESCO (IGBC).

Щури утримувались в умовах віварію по 4 особини в одній клітці, при середній температурі повітря  $+20...+24$  °C та відносній вологості повітря 60-75%.

Було забезпечено 3-ьох разове збалансоване харчування та вільний доступ до води.

Перед початком дослідів усі щури перебували протягом 2-ох тижнів в умовах віварію з метою адаптації.

Після завершення періоду адаптації, починаючи з першого дня дослідів, щурам було уведено підшкірно, в ділянці спини, по 0,06 мг/кг маси тіла естрадіолу валерату. Ін'єкцію естрадіолу валерату у дозі 0,06 мг/кг було повторно виконано на третій день дослідів.

На третій день дослідів було виключено останнє харчування, також як і в першій половині четвертого дня.

На четвертий день дослідів було виконано експериментальну індукцію ендометріозу шляхом оперативного втручання та імплантації аутологічного фрагменту матки за методикою А. Golan та співавт. [108] та Т.Hirata та співавт. [122]. При пробудженні від анестезії щури були рандомізовані та рівномірно розподілені по групах.

Внаслідок оперативного втручання загинули 3 тварини: 2 тварини внаслідок ускладнень від знечулення (на перший день після оперативного втручання) та 1 тварина внаслідок інфекційних ускладнень (на третій день після оперативного втручання).

Щурам усіх груп проводилася естрогенна підтримка експериментальної моделі ендометріозу у вигляді щоденних підшкірних ін'єкцій у дозі 0,03 мг/кг маси тіла естрадіолу валерату до останнього дня досліду.

У першій дослідній групі, яку складав 21 щур, був застосований агоніст дофамінових рецепторів у вигляді підшкірних ін'єкцій у дозі 0,075 мг/кг маси тіла тварини щоденно.

У другій дослідній групі, яка складала 19 щурів, було застосовано у комплексі агоніст дофамінових рецепторів та високоселективний інгібітор ЦОГ-2 у вигляді окремих підшкірних ін'єкцій агоніста дофамінових рецепторів у дозі 0,075 мг/кг маси тіла тварини та високоселективного інгібітора ЦОГ-2 у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини щоденно.

У третій дослідній групі, яка складала 20 щурів, було застосовано високоселективний інгібітор ЦОГ-2 у вигляді підшкірних ін'єкцій у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини щоденно.

У четвертій, контрольній групі, яка складала 20 щурів, окрім естрогенової підтримки не було застосовано жодних інших засобів.

У першій, другій та третій дослідних групах лікарські засоби застосовували починаючи з 12-го дня досліду (з 8-го дня після оперативного втручання) та до завершення досліду (25-ий день досліду, 21-ий день після оперативного втручання).

На 26-ий день досліду (22-ий день після оперативного втручання) було виконано евтаназію шляхом декапітації з використанням тіопенталового знечулення у дозі 5-7 мг/кг маси тіла тварини.

Після евтаназії одразу ж було виконано розтин черевної порожнини П-подібним розрізом задля збереження цілісності ендометріюїдних імплантів.

Згодом проводилось макроскопічне дослідження імплантів та сепарування уражень від підлеглого шару очеревини та м'язів черевної стінки (зі збереженням цілісності кістозних утворень, якщо вони мали місце) для подальшого гістологічного дослідження.

Дослідження проводилися з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.) і наказів МОЗ України № 960 від 23.09.2009 р. та № 944 від 14.12.2009 р.

## 2.2 Характеристика груп обстежених жінок з зовнішнім генітальним ендометріозом

У зв'язку з поставленою метою нами було обстежено 43 жінки репродуктивного віку, які проходили лікування в Медичному центрі лікування безпліддя (м.Чернівці). Всі пацієнтки були розподілені на наступні досліджувані групи:

- Контрольна група пацієнток, у яких відсутні лапароскопічні/ультрасонографічні ознаки ендометріозу (12 пацієнток)
- Пацієнтки з лапароскопічно/ультрасонографічно підтвердженим ендометріозом (31 пацієнтка).

У контрольну групу увійшло 12 соматично здорових жінок, які проходили лікування з приводу запальних захворювань органів малого тазу і яким проводилася лапароскопія та/або гістероскопія або біопсія ендометрія з діагностичною метою.

Критеріями включення стали: відсутність ультрасонографічних та/або лапароскопічних ознак ендометріозу, відсутність скарг на біль внизу живота залежно або незалежно від менструації, відсутність злоякісних захворювань яєчників та матки, відсутність хірургічних втручань на шийці матки.

Критеріями виключення в контрольну групу стали: наявність ультрасонографічних ознак наявності об'ємних утворень в малому тазу,



наявність ультрасонографічних ознак глибокого ендометріозу очеревини, наявність злоякісних захворювань яєчників та матки.

Консультативний прийом та обстеження хворих здійснювалося на базі Медичного центру лікування безпліддя (м.Чернівці) у кілька етапів, які включали вивчення спадкового, соматичного, гінекологічного і акушерського анамнезу, клінічні, функціональні і лабораторні дослідження в динаміці обстеження, відбір пацієнтів з підозрою на ендометріоз для проведення подальшої лапароскопії та оцінка ефективності запропонованого алгоритму діагностичних та лікувальних заходів.

У всіх пацієнток з підозрою на ендометріоз первинне клініко-лабораторне та інструментальне обстеження виконано на час амбулаторного прийому та на час поступлення у клініку для проведення інтервенційних методів обстеження.

На першому етапі обстеження включало детальну бесіду із жінками з ретельним вивченням спадкового, соматичного, гінекологічного і акушерського анамнезу, перенесених інфекційних, екстрагенітальних захворювань та оперативних втручань.

Критеріями включення стали наступні: репродуктивний вік, вік більше 18 років, наявність суб'єктивних, соматичних та ультрасонографічних ознак ендометріозу [23], згода жінки на проведення оперативного лікування, згода жінки на участь у дослідженні, відсутність тяжких порушень функціонування нирок та печінки, відсутність злоякісних пухлин в яєчниках та матці, перитонеальний ендометріоз II-III ступеня.

Критеріями виключення вважали: вік менше 18 або більше 40 років, відсутність згоди пацієнтки на оперативне лікування, відсутність згоди жінки на участь у дослідженні, прийом гормональних препаратів протягом останнім 3-х місяців, підозра на злоякісну пухлину жіночих статевих органів.

Другий етап передбачав повноцінне клініко-лабораторне обстеження, передбачене наказом МОЗ №787 від 09.09.2013 року та наказом МОЗ №319 від 06.04.2016 або наказом МОЗ №417 від 15.07.2011: діагностичний комплекс,

який включав клінічні, функціональні, лабораторні обстеження, оцінку ехоструктури органів малого тазу, особливостей стану ендометрія (ехографічні, ендоскопічні), у результаті чого було проведено відбір пацієнток для оперативного лікування та диференційованого застосування запропонованого діагностичного комплексу.

На наступному етапі для оцінки робочої гіпотези було проведено дослідження отриманого біологічного матеріалу зі застосуванням, як стандартних гістологічних технік (фарбування за допомогою гематоксилін-еозину), так і імуногістохімічних.

На четвертому етапі у клінічну практику було впроваджено оптимізований алгоритм ранньої діагностики ендометріозу.

Дисертаційна робота пройшла експертизу у комісії з питань біомедичної етики Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (протокол № 1 від 08.09.2016 р).

## 2.3 Методи дослідження

### 2.3.1 Моделювання перитонеального ендометріозу у щурів

Моделювання перитонеального ендометріозу проводили шляхом оперативного втручання [242]. З метою знечулення, вводили 45 мг/кг кетаміну (0,9 мл/кг 5% розчину кетаміну) та 7 мг/кг седазину (або 0,35 мл/кг маси тіла 2% розчину седазину) в одному шприці внутрішньоочеревинно. Глибину знечулення перевіряли за допомогою корнеальних та карпо-педальних рефлексів.

Після знечулення та перед лапаротомією, за допомогою бритви та/або гелю Veet® видаляли шерстяний покрив з черевної стінки. З метою уникнення висихання рогівки ока застосовували фізіологічний розчин. Операційне поле обробляли 1% розчином йоду двічі. В асептичних умовах виконували нижньо-серединну лапаротомію довжиною 7-10 мм. Після розкриття очеревини

ідентифікували лівий ріг матки, мобілізували по довжині та лігували яєчникову зв'язку та артерію за допомогою стерильної поліамідної нитки 5-0. Згодом проводили лігування рогу матки проксимально, відступивши 1-2 мм від шийки матки та відсікали дистальний та проксимальний кінець маткового рогу відступивши відповідно від лігатур та відділяли брижу рогу матки.

Матковий ріг розміщали на стерильному скельці та за допомогою скальпеля та бранш анатомічного пінцету малих розмірів розділяли від брижі, а згодом проводили лонгітудинальний розтин. З отриманого прямокутника, який представляв собою розгорнутий циліндр маткового рогу, утворювали стандартні фрагменти розмірами 5x3мм. Дані фрагменти фіксували до внутрішньої поверхні очеревини передньої черевної стінки щура за допомогою двох вузлових поліамідних швів 6-0. Фрагмент розміщували міометральним шаром обернутим до очеревини, а ендометріальним – до очеревинної порожнини.

Рану зашивали пошарово: один ряд поліамідних швів 5-0 на перитонеально-м'язевий шар, інший ряд – на шкіру. Післяопераційну рану обробляли 1% розчином йоду. Оперативні втручання тривали 22-35 хв. в залежності від анатомічних особливостей тварини.

В післяопераційному періоді експериментальні тварини перебували в окремих клітках з підігрівом. Після появи впевненої рухової активності, в середньому через 2 години, тварин розподіляли рандомізовано згідно дослідних груп, а саме: розміщували в одній клітці по одній тварині з кожної дослідної групи, відповідно промаркувавши їх, таким чином утворювали абсолютно рівні умови для тварин усіх груп. Згодом вводили підшкірно підтримуючу дозу естрадіола валерату (0,03 мг/кг маси тіла) та давали пиття *ad libitum*. Харчування продовжували з наступного дня аналогічним раціоном, як і до оперативного втручання.

В післяопераційному періоді проводили повторну обробку післяопераційної рани 1% розчином йоду на 2-ий та 4-ий день після оперативного втручання [243].

### 2.3.2 Макроскопічне дослідження ендометріюдних уражень

Після евтаназії розкривали черевну порожнину П-подібним розрізом з метою збереження цілісності імплантів. Ідентифікували локалізацію обох підсаджених фрагментів матки та виконували знімки уражень на цифрову дзеркальну фотокамеру Canon EOS 550D.

Макроскопічно оцінювали наявність та тип уражень: кісти заповнені темною рідиною, кісти заповнені світлою рідиною, ураження у вигляді солідної тканини або відсутність макроскопічних ознак ураження.

За допомогою офісної прозорої міліметрової лінійки вимірювали найменший та найбільший діаметр уражень.

З метою визначення об'єму уражень використовували наступну формулу (2.1):

$$V = \frac{2}{3} * \pi * \left( \left( \frac{d_1 + d_2}{4} \right)^3 \right) \quad (2.1)$$

де  $d_1$  та  $d_2$  – це відповідно найменший та найбільший діаметр ураження.

Виходячи з даних про те, що ураження в даній експериментальній моделі мають переважно напівсферичну форму, вирішено використовувати формулу об'єму напівсфери (1) з деякими практичними модифікаціями для визначення об'єму уражень.

З метою об'єктивізації типів уражень, враховуючи, як їх розміри, так і активність, ми використовували шкалу Quereda та співавт. [244]. Згідно неї визначали ступінь росту імпланту (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Ступінь росту імпланту за Quereda та співавт.

| Ступінь росту | Критерій                                                                                                                                   |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0             | Імплант зник/розсмоктався або якщо його можна візуалізувати, він не є кістою.                                                              |
| I             | Імплант формує везикулу, найбільший діаметр якої складає менше 2 мм, або, якщо він більший, та має солідний стан.                          |
| II            | Імплант формує кісту із рідиною, а її найбільший діаметр більше або дорівнює 2 мм, проте менше 5 мм (менше чим початковий розмір імпланту) |
| III           | Діаметр кісти аналогічний або більший чим початковий розмір імпланту (більше 5мм)                                                          |

Імпланти, які мали II та III ступінь росту вважали імплантами із адекватним ростом.

### 2.3.3 Гістологічне дослідження ендометріюідних уражень

Забір матеріалу для морфологічних досліджень проводили згідно стандартних вимог для виготовлення гістологічних препаратів. Фіксація фрагментів тканин після промивання їх у дистильованій воді здійснювалася в 10-12%-ому розчині нейтрального формаліну, після чого їх переносили в 3-5%-ий розчин нейтрального формаліну, де вони і зберігалися. Зневоднювали препарати шляхом послідовного проведення об'єктів через етанол зростаючої концентрації.

У подальшому заливали в парафін і робили гістологічні зрізи мікротомом товщиною від 3 до 5 мкм. Для отримання диференційованої поліхромії тканин фарбували їх гематоксилін-еозином. На санному мікротомі робили серійні гістологічні зрізи товщиною 5 мкм.

Використовували оглядові гістологічні (колорування гематоксиліном та

еозином) методики. Гістологічні зрізи вивчали, аналізували і фотографували за допомогою системи аналізу зображень на базі комп'ютера, що складається зі світлового мікроскопа Olympus CX-21 і цифрової фотокамери Olympus C450.

З метою об'єктивізації даних гістологічного дослідження проводили морфометричні вимірювання характеристик тканин на отриманих мікрофотографіях. До характеристик, які підлягали вимірюванню належали:

- товщина залозистого шару клітин;
- площа ядерної ділянки клітин залозистого епітелію;
- товщина секреторної частини клітин залозистого епітелію.

Також визначали денситометричну густину ядер залозистого епітелію та денситометричну густину клітини взагалом. Для визначення денситометричної густини використовували вбудований у ПЗ ImageJ інструмент Гістограма (Histogram) у режимі монохромної гістограми. Отримували значення у 8-бітному діапазоні – від 0 до 255, де 0 – це повна непрозорість ділянки (темна ділянка) зображення, а 255 – відповідно, повна прозорість ділянки (світла ділянка) зображення.

Усі вимірювання виконували на фотографіях зрізів за допомогою програмного забезпечення ImageJ, яка вільно розповсюджується Національним Інститутом Здоров'я (НИН) США.

#### 2.3.4 Загальноклінічні, клінічні та імунологічні методи дослідження.

Оцінка соматичного та гінекологічного статусу

У всіх 43 обстежених жінок проводилися загально-клінічні дослідження, біохімічні дослідження крові, а також коагулограму. У 100% (31) пацієток з дослідної групи та у 50% (6) жінок з контрольної групи проводилося дослідження на онкомаркери СА-125 та HE4 та проводився розрахунок індексу ROMA (за Roche). Для цього кров для дослідження набирали безпосередньо перед проведенням оперативного втручання або о 9-ій годині ранку. Було проведено центрифугування, сироватка зберігалася при температурі -20 °C до

використання. Визначення СА-125 та HE4 у сироватці крові проводили на повністю автоматизованому хемілюмінесцентному аналізаторі Cobas 6000 з використанням відповідного діагностичного набору відповідно до протоколу виробника (Roche Diagnostics, Швейцарія). Отримані результати порівнювали з референтними нормами для здорових жінок.

*Гістологічні та імуногістохімічні методи дослідження.* Гістологічне дослідження матеріалу виконували після фіксації формаліном на парафінових зрізах із зафарбовуванням гематоксилін-еозином і за Ван-Гізоном. Оцінювали активність залоз, строми, наявність вакуолей в клітинах епітелію, стан просвіту залоз, наявність секреції, діаметр, наявність псевдостратифікації епітелію залоз, пропорцію залоз і строми, стан судин строми, наявність набряку строми, форми епітеліальних клітин. Розрізняли нормальний, атрофічний і гіперпластичний ендометрій, десинхронізацію розвитку залоз та строми. Для характеристики нормального ендометрія використовували критерії Noyes і співавторів (1950).

Біоптат ендометрія або зішкріб тканини ендометрія фіксували у 10 % формаліні і передавали у патогістологічну лабораторію.

Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Фотодокументування виконували за допомогою мікроскопа Olympus CX-21, цифрової камери Olympus C450, під'єднаної до персонального комп'ютера. Реальне збільшення на мікрофотографіях складає відповідно для об'єктива x8 – x40 та для об'єктива x20 – x200.

Імуногістохімічне дослідження з визначення експресії MMP2, MMP9 та рецепторів VEGFR-2, як для біологічного матеріалу, який походив від лабораторних щурів, так і який походив від пацієнтів, проводилося з використанням первинних антитіл до MMP-2, MMP-9, VEGFR-2 виробництва Abscam (Кембрідж, Об'єднане Королівство). Візуалізацію первинних антитіл виконали з використанням системи детекції HRP/DAB (HRP/DAB Detection IHC kit) з використанням діамінобензенового барвника (виробництво Abscam,

Кембрідж, Об'єднане Королівство). Ядра клітин були додатково зафарбовані за допомогою розчину гематоксиліну Майєра або Грота.

1. Депарафінізація та регідратація (послідовна батарея з ксилолу, етанолу та води).
2. Виконувався пероксидазний блок.
3. Промивка у двох змінах води.
4. Промивка у двох змінах буфера з рН 7,6
5. Інкубація з первинними антитілами (титр розраховували згідно рекомендацій виробника).
6. Промивка у чотирьох змінах буфера з рН 7,6.
7. Нанесені біотинилінованих антитіл.
8. Промивка у чотирьох змінах буфера з рН 7,6.
9. Нанесення стрептавідин-пероксидази
10. Промивка у чотирьох змінах буфера з рН 7,6.
11. Нанесення розчину хромогену/субстрату (співвідношення 1/50)
12. Промивка у чотирьох змінах буфера з рН 7,6.
13. Нанесення гематоксиліну Майєра або Грота.
14. Промивка у воді.
15. Дегідратація, просвітлення, заключення.

### 2.3.5 Методи статистичного аналізу

Статистичний аналіз отриманих даних проводився методами варіаційної статистики з визначенням середніх величин ( $M$ ), середньої похибки ( $m$ ), середньоквадратичного відхилення ( $\sigma$ ). Імовірність кожного показника визначали за статистичним критерієм Стьюдента.

Середнє арифметичне ( $M_x$ ) визначали за формулою (2.2)

$$M_x = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{n} \quad (2.2)$$

де  $a$  – абсолютні цифри ряду спостережень, що аналізується,  $n$  – число спостережень в даному ряді.



Середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) вираховували методом різниць.

Для цього із варіаційного ряду від найбільшої варіанти віднімали найменшу. Отриману різницю ділили на коефіцієнт  $K$ , знайдений по таблиці методу різниць, залежно від кількості ( $n$ ). Середню ймовірну похибку ( $m$ ) для абсолютних величин вираховували за наступними формулами (2.3; 2.4):

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}, \text{ якщо } n < 30 \quad (2.3)$$

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ якщо } n > 30 \quad (2.4)$$

де  $\sigma$  – середнє квадратичне відхилення,  $n$  – число спостережень.

Для визначення середньої похибки ( $m$ ) відносних величин була використана формула (2.5):

$$m = \pm \sqrt{\frac{P-(100-P)}{n}} \quad (2.5)$$

де  $P$  – показник відносної величини у відсотках,  $n$  – число спостережень.

Достовірність вибіркової різниці вимірювалася довірливим критерієм точності ( $t$ ). Для оцінки достовірності різниці абсолютних величин користувалися наступною формулою (2.6):

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (2.6)$$

а для відносних величин (2.7):

$$t = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (2.7)$$

де  $M_1$  і  $M_2$  – середньоарифметичні показників, які порівнюються,  $P_1$  і  $P_2$  – відносні величини у відсотках,  $m_1^2$  і  $m_2^2$  – квадрати середніх ймовірних похибок.

Величину  $P$  (достовірність різниці) визначали по таблиці Стьюдента-Фішера. Різниці між середніми величинами, які порівнювалися вважалися достовірними при  $P < 0,05$ .

Нормальність розподілу параметрів у вибірках перевіряли за тестом Колмогорова-Смирнова за кількості варіант  $\geq 50$ , за меншої кількості – за

критерієм Shapiro-Wilk. Достовірність даних вираховували із застосуванням двовибіркового (для незалежних вибірок) t-критерію Student при розподілі близькому до нормального. При нерівномірному розподілі використали U-критерій Wilcoxon-Mann-Whitney (для незалежних вибірок). Дані наводили у вигляді  $M \pm m$ .

Біваріантна кореляція між двома змінними визначали за допомогою коефіцієнту кореляції Пірсона (Pearson) за формулою 2.8.

$$r_{xy} = \frac{n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2][n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]}} \quad (2.8)$$

### 2.3.6 Методи об'єктивізації імуногістохімічних зображень

Для аналізу імуногістохімічних зображень нами було застосовано програмне забезпечення ImageJ (безкоштовне програмне забезпечення) останньої версії 1.48 (НИН, Bethesda, Maryland) (Java 1.8.9). Ми використали застосунок (плагін) ІНС Profiler [245, 246] з режимом цитоплазматичного зафарбування для об'єктивізації даних із зображень та їх кваліфікації. Зображення були кваліфіковані як високо-позитивні, позитивні, низько-позитивні та негативні з вказанням відсотку відповідних клітин. Як результат кваліфікації нами був розрахований показник оптичної щільності імуногістохімічних зображень (оптична щільність ІГХ), розрахований за допомогою наступної формули [247]:

$$\begin{aligned} \text{Оптична щільність ІГХ} = & (\text{відсоток високо-позитивних клітин} \times 4 + \\ & \text{відсоток позитивних клітин} \times 3 + \text{відсоток низько-позитивних клітин} \times 2 + \\ & \text{відсоток негативних клітин} \times 1) / 100 \end{aligned} \quad (2.9)$$

У випадку коли у полях зору спостерігалися лише поодинокі зафарбовані клітини при імуногістохімічному дослідженні ми застосовували метод прямого підрахунку зафарбованих клітин [246] та порівнювали їхню кількість при статистичній обробці.

### РОЗДІЛ 3

## ІМПЛЕМЕНТАЦІЯ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ

Для оцінки ефективності застосування лікарських засобів, зокрема агоніста дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітора ЦОГ-2, необхідна стабільна та надійна експериментальна модель ендометріозу [248].

Згідно даних літератури існують кілька варіантів індукції у щурів [108-112]. Нами був обраний метод А. Golan та співавт. (1984) [108] та Т.Hirata та співат. (2005) [122, 249, 250], при якому фрагменти ендометріально-міометрального шару прикріплюються до внутрішньої поверхні парієтальної очеревини ендометріальним шаром, орієнтованим досередини, в очеревинну порожнину. Це дає певні переваги, зокрема: можливість контролювати кількість аутотрансплантованої тканини, можливість легкої макроскопічної оцінки уражень та їх подальше сепарування та гістологічне дослідження. Серед недоліків даного методу слід зазначити необхідність наявності мікрохірургічних навиків, так як діаметр рогу матки у щурів не перевищує зазвичай 3-3,5 мм. Необхідність його лонгітудинального розкриття, формування клаптів та їх фіксація до очеревини також вимагає певних навиків.

Орієнтація клаптя рогу матки з оберненим досередини (в очеревинну порожнину) ендометріальним шаром при фіксації обумовлюється особливістю васкуляризації та росту ендометріюїдподібних кіст в подальшому.

Дана група складалася з 20-ти дорослих самок білих щурів, які ще не народжували, вагою 170-200 г.

Перед проведенням оперативного втручання для індукції експериментальної моделі ендометріозу, нами було проведено 2-ох разове уведення естрадіолу валерату у подвійній підтримуючій дозі (0,06мг/кг) через день, двічі – на 1-ий та 3-ій день досліду, а на 4-ий проводили оперативне

втручання. Це обумовлено тим, що тварини, які брали участь у досліді могли знаходитися в різні фази естрального циклу. Дворазове введення естрадіолу валерату з інтервалом у день призводило до вирівнювання естрального циклу та переходу у еструс, як можна було спостерігати за змінами в зовнішніх статевих органах тварин. Саме в цій фазі відбувається найактивніша секреторна активність рогів матки, що призводить до певного їх розширення, а це в подальшому технічно полегшує їх виділення та утворення клаптів. З іншого боку, у фазі еструса ендометрій знаходиться в стані проліферації та секреції. Його алотрансплантація в даний період максимально наближає умови до тих, що виникають при ендометріозі у людини.

Після проведення оперативного втручання щурам вводили підтримуючу дозу естрадіолу валерату (0,03 мг/кг) щодня підшкірно в ділянці спини. Це є необхідним у зв'язку з виконанням оваріектомії, що дозволило усунути можливі гормональні коливання у подальшому та різницю у гормональному фоні між різними особинами [243].

З метою нівелювання можливого впливу стресу, тваринам даної групи іншим стерильним інсуліновим шприцем вводили 0,9% розчин натрію хлориду в аналогічному об'ємі, як і об'єм фармацевтичних речовин у інших досліджуваних групах. Також, з метою усунення можливого впливу стресу, з метою фіксації тварин при підшкірному введенні та при інших маніпуляціях не використовували корцанг чи інший хірургічний інструментарій, натомість фіксацію проводили за допомогою руки.

У зв'язку з неможливістю моніторингу росту ендометріюїдподібних уражень як у контрольній, так і у дослідних групах існує вимога стосовно надійності індукованої моделі задля усунення хибно-позитивних результатів при лікуванні. Для цього розміри клаптів було уніфіковано, щури було обрані з приблизно однаковою вагою серед тих, що ще не народжували, задля усунення можливих морфологічних змін, які відбуваються в міометрії та ендометрії після вагітності. Дана особливість надавала перевагу і при проведенні естрогенової

підтримки, так як виключалась імовірність помилки при виборі дози естрадіолу валерату.

У даній групі (контрольній) з метою верифікації валідності експериментальної моделі ендометріозу, аналогічно дослідним групам, проводилась макроскопічна оцінка, морфометрія уражень та гістологічні дослідження, а також мікроморфометрія.

### 3.1 Макроскопічне дослідження ендометріюваних вогнищ

Макроскопічне дослідження ендометріюваних вогнищ проводили одразу після евтаназії, після розкриття черевної порожнини щура П-подібним розрізом.

Враховуючи той факт, що в клінічній медицині єдиним достовірним методом діагностики ендометріозу є візуальна ідентифікація вогнищ при лапароскопії з подальшою гістологічною верифікацією, а ступінь важкості ендометріозу визначається розмірами, кількістю вогнищ та їх локалізацією, на нашу думку, є доцільною візуальна оцінка та проведення морфометрії при експериментальній моделі ендометріозу.

На основі даних морфометрії визначали об'єми уражень, що є ще одним параметром об'єктивізації при проведенні статичних досліджень.

Враховуючи, що індукований експериментальний ендометріоз у щурів зазвичай проявляється ростом кіст [59, 108, 113], при оцінці валідності контролю, при макроскопічній оцінці наша увага була привернута саме до пошуку цих структур та визначення їх типів.

Зважаючи на те, що пересаджували по два клаптя власного рогу матки кожній тварині, кількість випадків, відповідно, подвоюється стосовно кількості тварин у даній групі.

При визначенні типів уражень отримані наступні дані (рис. 3.1): у 45% випадків (18 аутотрансплантованих клаптів) визначено кістозні структури з

мутним або темним вмістом (рис. 3.2), у 50% (20 аутотрансплантованих клаптів) – визначено кістозні структури з прозорим або майже прозорим вмістом (рис. 3.3, рис. 3.4), у 5% (2 аутотрансплантовані клапті) – не визначено кістозних структур, проте виявлено ознаки ураження очеревини (гіперемія та набряк) (рис. 3.5).



Рисунок 3.1 – Типи ендометріюїдних уражень, визначені при макроскопічній оцінці



Рисунок 3.2 - Ендометріюїдні кістозні структури з темним вмістом

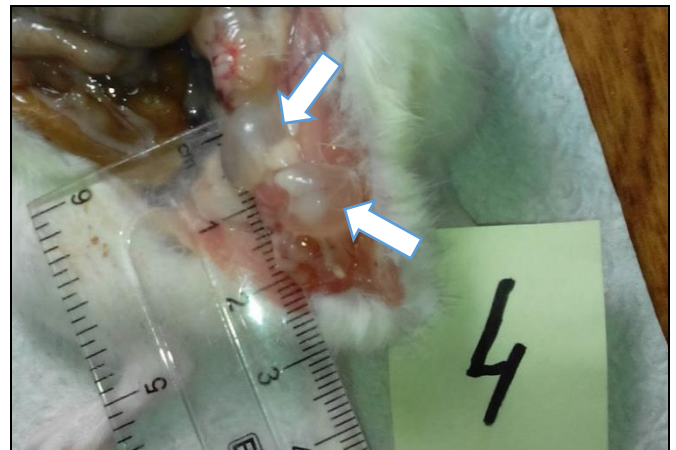


Рисунок 3.3 - Ендометріюїдні кістозні структури зі світлим вмістом

При морфометрії у контрольній групі з індукованою моделлю експериментального ендометріюзу отримали наступні дані: середній

найбільший діаметр уражень складав  $(9,92 \pm 2,09)$  мм, середній найменший діаметр уражень –  $(8,42 \pm 2,02)$  мм.

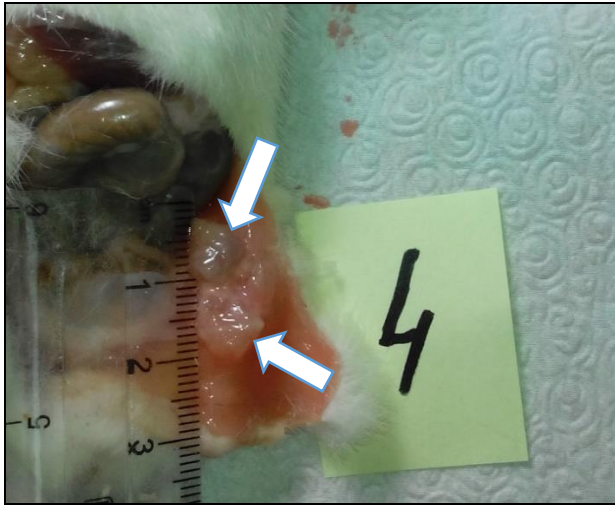


Рисунок 3.4 – Ендометріюїдні кістозні структури з темним та світлим вмістом

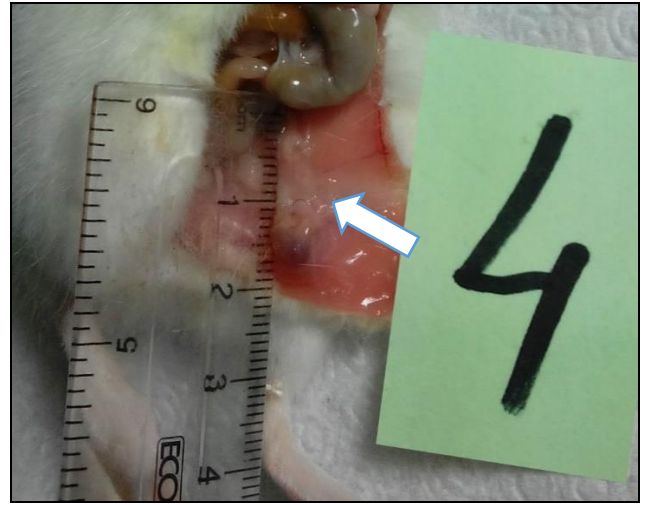


Рисунок 3.5 – Ендометріюїдні ураження без кістоподібних утворень

Результати проведення тесту Колмогорова-Смірнова для ряду отриманих значень представлені на рис. 3.6 та рис. 3.7.

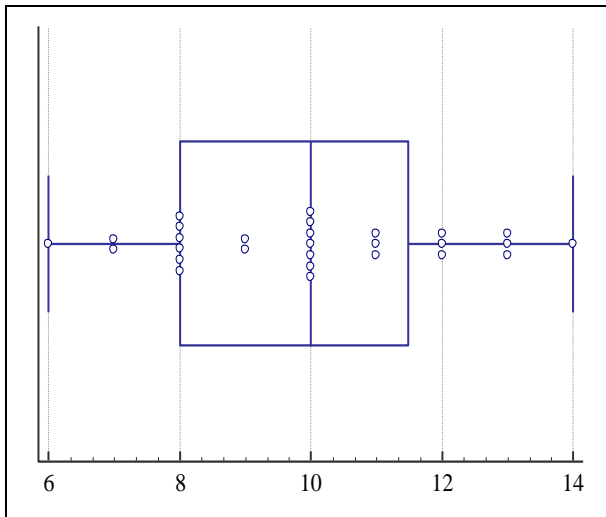


Рисунок 3.6 – Розподіл значень для найбільшого розміру кістоподібних утворень, мм

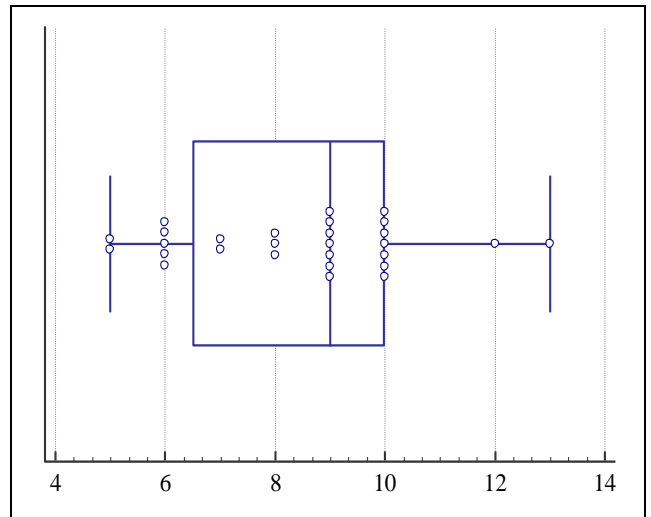


Рисунок 3.7 – Розподіл значень для найменшого розміру кістоподібних утворень, мм

Як можемо побачити з рис. 3.6 та рис. 3.7 та після проведення тесту Колмогорова-Смірнова, варіаційний ряд значень розмірів кістоподібних ендометріюїдних утворень є близьким до нормального розподілу, має незначний інтервал значень, що вказує на рівномірність макроскопічної картини та можливість використання даних значень в якості референтних при порівнянні з групами досліду.

Середній об'єм ендометріюїдних кістоподібних утворень, розрахований за модифікованою формулою напівсфери, склав  $(243,88 \pm 99,96) \text{ мм}^3$ .

Як можна побачити з рис. 3.8, розподіл значень об'єму у контрольній групі дослідження є близьким до нормального, а довірчий інтервал знаходиться у межах  $198,68 \text{ мм}^3 - 289,09 \text{ мм}^3$ , що також вказує на макроскопічну рівномірність та валідність отриманої експериментальної моделі.

Усі зразки отриманих уражень, окрім 2-ох із загальної сукупності, належали до III ступеня росту імпланту за Quereda.

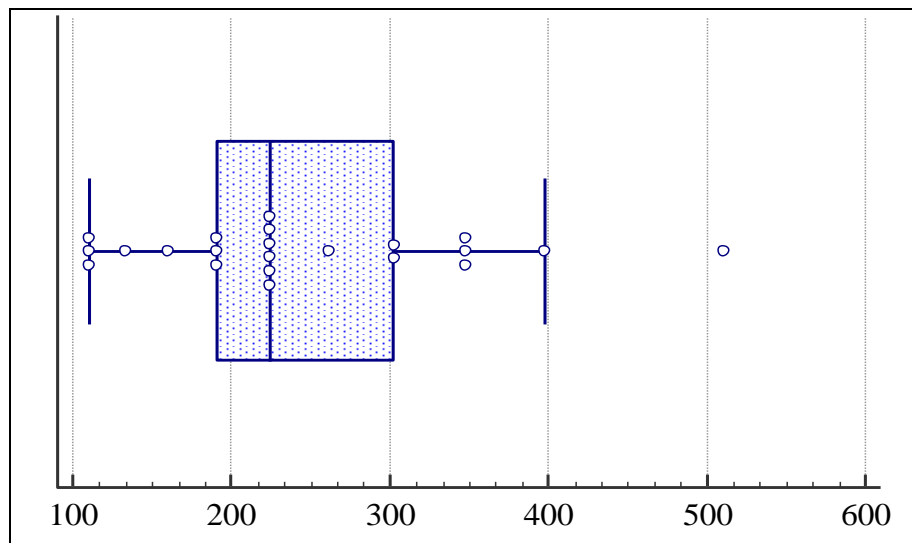


Рисунок 3.8 – Розподіл значень об'єму кістоподібних утворень,  $\text{мм}^3$

### 3.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Забір матеріалу для гістологічного дослідження проводили одразу після макроскопічного дослідження згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.



Проведено дослідження гістологічних препаратів тканини індукованого ураження. Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному мікротомі робили гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксилином і еозином.

При мікроскопічному дослідженні ендометріюідних уражень спостерігали залозистий секретуючий епітелій, орієнтований секретуючим полюсом в бік порожнини кісти; нижче розташувалася цитогенна строма, яка відповідно лежала на міометральній основі (яка збереглась при трансплантації). В мікропрепаратах також визначали залишки шовного матеріалу (рис. 3.9), що свідчить про належність даного фрагменту тканин до трансплантованих фрагментів рогу матки.

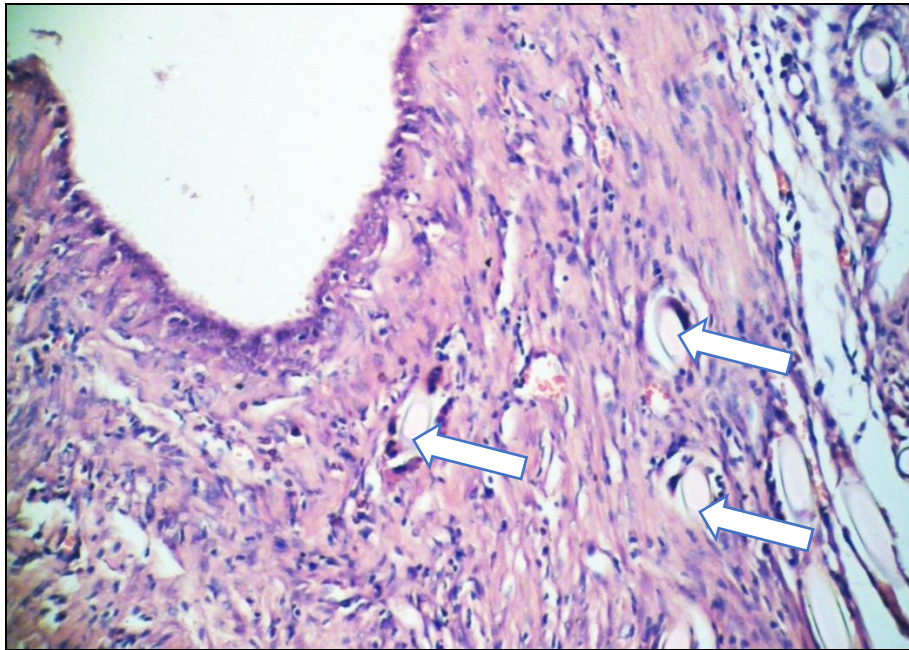


Рисунок 3.9 – Контрольна група щурів з експериментальним ендометріозом, 26-ий день дослідю.

Стрілками позначені залишки шовного матеріалу.

Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

При мікроскопічному дослідженні ендометріюїдних уражень спостерігали залозистий секретуючий епітелій, орієнтований секретуючим полюсом в бік порожнини кісти; нижче розташувалася цитогенна строма, яка відповідно лежала на міометральній основі (яка збереглась при трансплантації). В мікропрепаратах також визначали залишки шовного матеріалу (рис. 3.9), що свідчить про належність даного фрагменту тканин до трансплантованих фрагментів рогу матки.

Задля об'єктивізації мікроскопічного дослідження використовували кілька морфометричних параметрів. Серед них: визначення висоти клітин залозистого епітелію, визначення висоти секреторної частини клітин залозистого епітелію, визначення площі ядра, проведення денситометрії ядра та клітини в цілому. Саме ці характеристики, на нашу думку, вказують на функціональну активність ендометріюїдних імплантів.

Дані морфометрії та їх статистична обробка наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Основні морфометричні характеристики залозистого епітелію експериментальних ендометріюїдних гетеротопій

| Гістологічний параметр                  | Середня | 95% ДІ середньої | Медіана | 95% ДІ медіани | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | Кількість вимірів |
|-----------------------------------------|---------|------------------|---------|----------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| 1                                       | 2       | 3                | 4       | 5              | 6                     | 7                  | 8                 |
| Висота клітини, мкм                     | 50,01   | 45,85-54,15      | 47,24   | 43,03-52,51    | 10,69                 | 2,02               | 58                |
| Висота секреторного полюсу клітини, мкм | 16,30   | 14,29-18,31      | 15,00   | 12,49-18,77    | 5,57                  | 0,98               | 42                |
| Площа ядра, мкм <sup>2</sup>            | 76,27   | 65,32-87,21      | 72,08   | 65,00-88,81    | 23,38                 | 5,22               | 50                |

Продовження таблиці 3.1

| 1                                 | 2      | 3             | 4      | 5             | 6     | 7    | 8  |
|-----------------------------------|--------|---------------|--------|---------------|-------|------|----|
| Відносна щільність ядра, 0-255    | 84,91  | 80,01-90,79   | 87,00  | 80,92-89,00   | 10,75 | 2,34 | 50 |
| Відносна щільність клітини, 0-255 | 109,95 | 105,16-114,73 | 112,00 | 103,48-119,00 | 10,51 | 2,29 | 50 |

Для кращого розуміння особливостей морфології ектопічного ендометріюідного імпланту у порівнянні з еутопічним ендометрієм, нами було виконано морфологічне та морфометричне дослідження останнього (еутопічного ендометрія) у абсолютно інтактних щурів (3 досліджувані тварини) (рис. 3.10, рис. 3.11). Еутопічний ендометрій щурів знаходився у фазі проеструса.

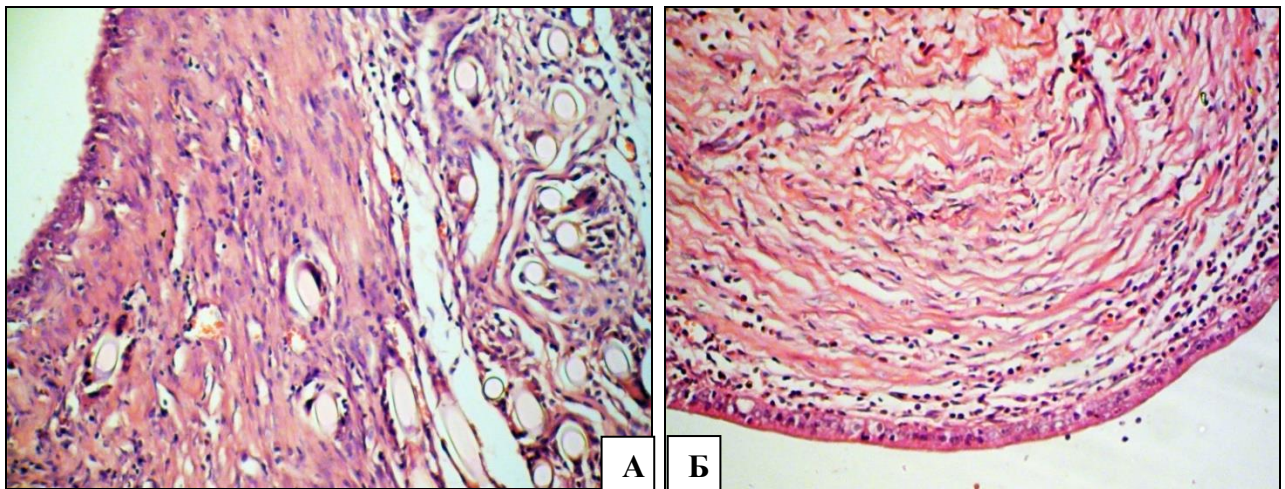


Рисунок 3.10 – А, Б - фрагменти ендометріюідного імпланту у щурів контрольної групи, 26-ий день дослідю.

Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

Нами були проведені аналогічні вимірювання морфометричних характеристик, як і у групі з гетеротопічним імплантом (таблиця 3.2).

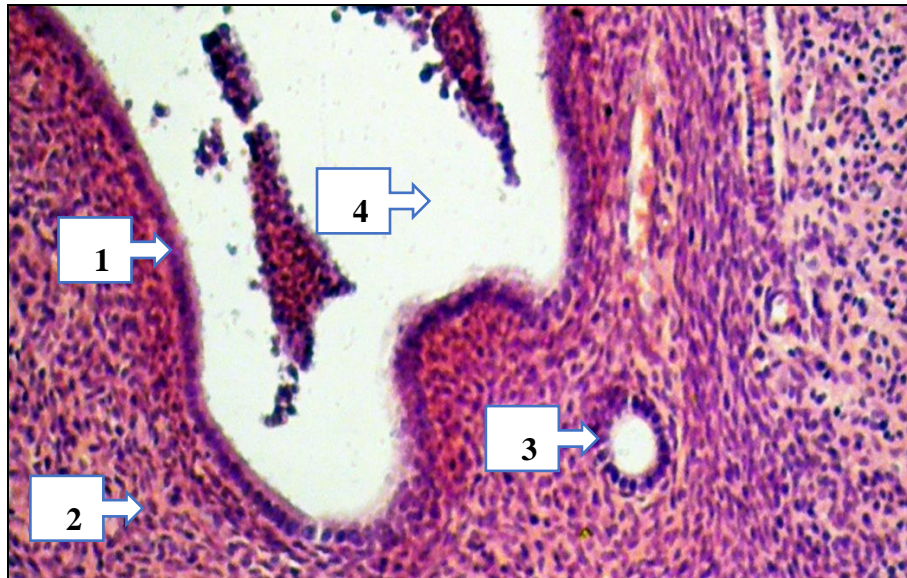


Рисунок 3.11 – Еутопічний ендометрій та міометрій у абсолютно інтактних щурів. 1 – залозистий епітелій, 2 – цитогенна строма, 3 – ендометріальна залоза, 4 – просвіт матки. Гематоксилін і еозин. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

Як можна побачити з наведених таблиць (табл. 3.1, 3.2) та з рисунків 3.11 та 3.12, існують певні відмінності у морфометричних характеристиках.

Таблиця 3.2 – Основні морфометричні характеристики залозистого епітелію еутопічного ендометрія у абсолютно інтактних щурах

| Гістологічний параметр                  | Середня | 95% Ді середньої | Медіана | 95% Ді медіани | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | Кількість вимірів |
|-----------------------------------------|---------|------------------|---------|----------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| 1                                       | 2       | 3                | 4       | 5              | 6                     | 7                  | 8                 |
| Висота клітини, мкм                     | 28,38   | 26,19-30,57      | 27,26   | 25,10-29,85    | 6,65                  | 1,07               | 28                |
| Висота секреторного полюсу клітини, мкм | 11,88   | 10,75-13,02      | 10,61   | 9,99-13,31     | 3,2                   | 0,56               | 28                |
| Площа ядра, мкм <sup>2</sup>            | 101,26  | 90,88-111,65     | 96,66   | 91,39-113,83   | 24,01                 | 5,01               | 28                |

Продовження таблиці 3.2

| 1                                 | 2      | 3             | 4     | 5             | 6     | 7    | 8  |
|-----------------------------------|--------|---------------|-------|---------------|-------|------|----|
| Відносна щільність ядра, 0-255    | 92,47  | 90,10-94,84   | 92,0  | 89,34-96,30   | 30,07 | 5,48 | 28 |
| Відносна щільність клітини, 0-255 | 111,08 | 108,04-114,12 | 110,0 | 107,00-115,00 | 7,02  | 1,46 | 28 |

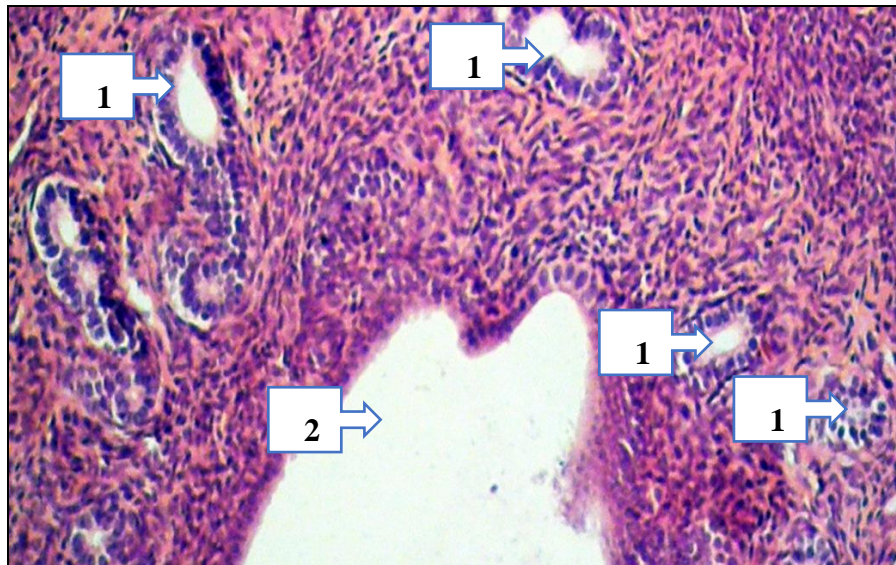


Рисунок 3.12 – Еутопічний ендометрій та міометрій у абсолютно інтактних щурів. 1 – ендометріальні залози, 2 – просвіт матки.

Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

В першу чергу це стосується висоти залозистих клітин, які мають достовірно більший розмір у ектопічному аутотрансплантованому ендометрії чим у еутопічному (рис. 3.13). Аналогічні зміни спостерігали і з розміром секреторного сегменту клітин (рис. 3.14). Проте, на нашу думку, ці морфометричні зміни викликані, ймовірно, змінами умов існування клітин у ектопічному транспланті, так як розміри та відносна щільність ядер не підтримують вищенаведену тенденцію.

Водночас, морфологічно спостерігаємо життєздатність та функціональну активність залозистого епітелію ектопічних трансплантів (рис. 3.15, рис. 3.16).

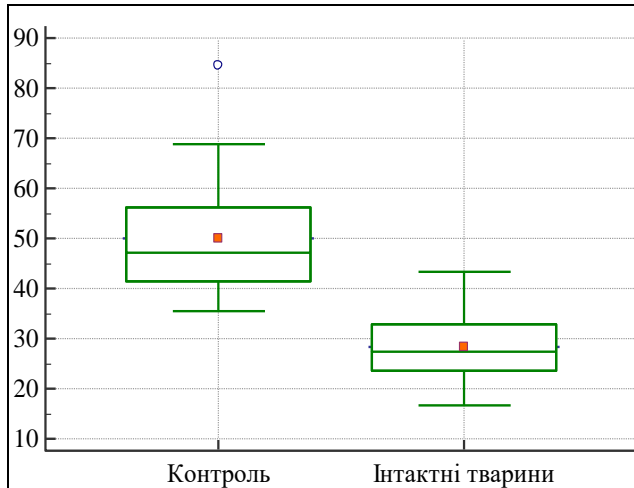


Рисунок 3.13 – Висота залозистого епітелію у контрольній групі та інтактних тваринах, мкм,  $p > 0,05$

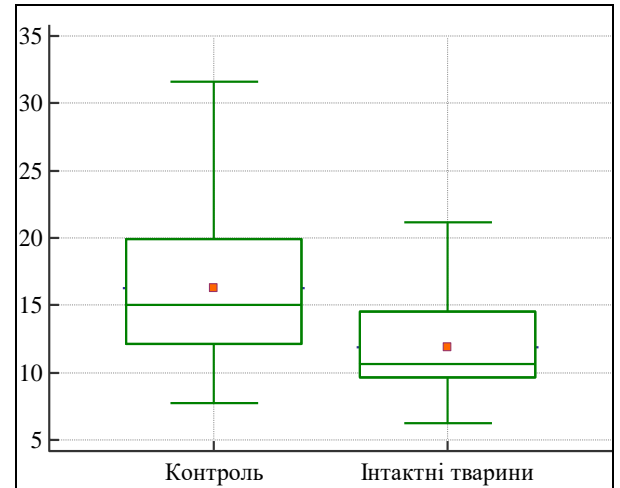


Рисунок 3.14 – Висота секреторного полюсу залозистого епітелію у контрольній групі та інтактних тваринах, мкм,  $p > 0,05$

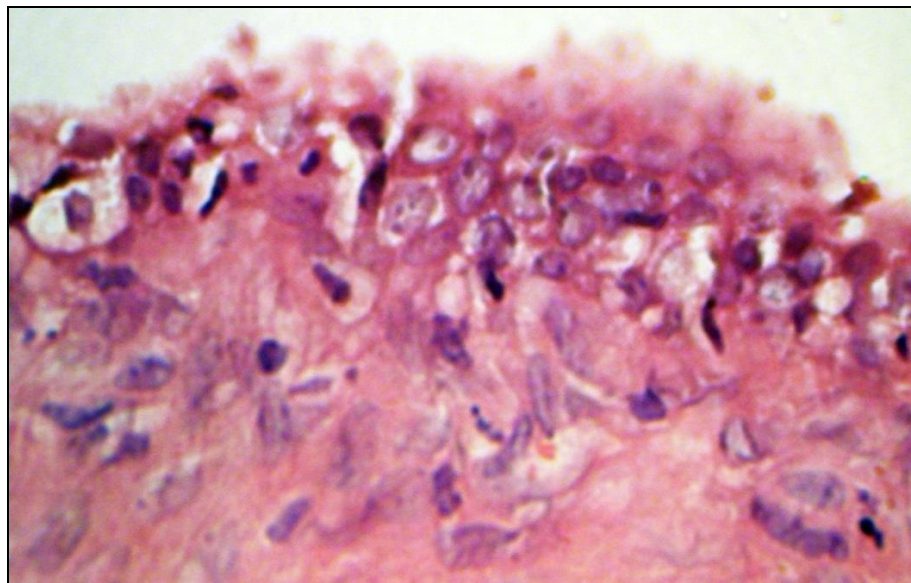


Рисунок 3.15 – Контрольна група щурів з експериментальним ендометріозом, 26-ий день дослідю. Гематоксилін і еозин. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

Отримані нами морфологічні дані відповідають даним джерел літератури, де використовувалась подібна або аналогічна методика. Так, Elgatal та співавт. (2016) [251] описують ектопічні ендометріюїдні вогнища макроскопічно у вигляді кіст заповнені рідиною, а гістологічна картина отримана нами,

повністю відповідає описаній картині Rezende та співавт. (1997) [252], Neto та співавт. (2007) [253] та Amaral та співавт. (2009) [254].

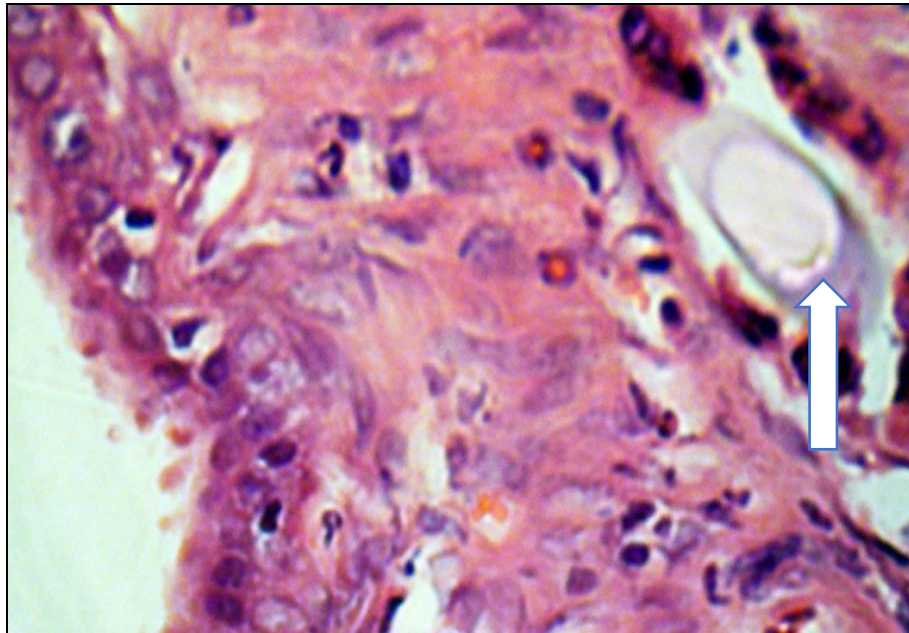


Рисунок 3.16 – Контрольна група щурів з експериментальним ендометріозом, 26-ий день дослідю. Стрілкою вказаний шовний матеріал. Гематоксилін і еозин.

Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

### **Висновки:**

1. Естрогенна підготовка тварин до оперативного втручання відіграє важливу роль для поліпшення технічних можливостей при виділенні рогу матки та його препаруванні.
2. Виконання оваріектомії з подальшою естрогенною підтримкою дозволяє усунути можливі циклічні зміни гормонального фону щура.
3. Проведені морфологічні та морфометричні дослідження свідчать про життєздатність та функціональну активність ектопічного ендометрія, що вказує на валідність експериментальної моделі та можливість її використання при дослідженні впливу біоактивних речовин на імплантацію та розвиток експериментальних ендометріюїдних вогнищ.

Результати розділу опубліковані в наукових працях автора: [242, 243, 249, 250, 255].

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ

4.1 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів

Дана група дослідження складалася з 21-єї особини дорослих самок білих щурів, які ще не народжували, вагою 170-200 г.

Перед проведенням оперативного втручання для індукції експериментальної моделі ендометріозу, нами було проведено 2-ох разове уведення естрадіолу валерату у подвійній підтримуючій дозі (0,06 мг/кг) через день, двічі – на 1-ий та 3-ій день досліду, а на 4-ий проводили оперативне втручання [242, 243].

Після проведення оперативного втручання щурам вводили підтримуючу дозу естрадіолу валерату (0,03 мг/кг) щодня підшкірно в ділянці спини. Це було необхідним у зв'язку з виконанням оваріектомії, що дозволило усунути можливі зміни у подальшому та різницю у гормональному фоні у різних особин [242, 256].

Окрім естрогенової підтримки у даній групі тварин також застосовували агоніст дофамінових рецепторів у вигляді підшкірних ін'єкцій у дозі 0,075 мг/кг маси тіла тварини щоденно [257]. Застосування даного лікарського засобу обумовлено його вираженою дією на D2-рецептори дофаміну, аналогічно бромкриптину, проте, на відміну від останнього, він має помітно менш виражені побічні дії та має менше дозування при аналогічних біологічних ефектах.



Очікуваним ефектом від застосування агоніста дофамінових рецепторів було пригнічення ангіогенезу за допомогою інгібування VEGF-шляху, так як за даними літератури дана група лікарських засобів інгібує VEGF-індуковане фосфорилування VEGFR-2 [217-219]. Також показано, що дофамін та його агоністи стимулюють інтерналізацію поверхні VEGFR-2, імовірно шляхом ендоцитозу, залишаючи менше VEGFR-2 на поверхні для взаємодії з VEGF [217-219]. Таким чином, інгібуюча дія дофаміну та його агоністів на VEGF-індукований ангіогенез пояснюється його дією на етапі ранньої сигналізації [258].

#### 4.1.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ проводили одразу після евтаназії, після розкриття черевної порожнини щура П-подібним розрізом.

Враховуючи той факт, що наразі єдиним достовірним методом діагностики ендометріозу є візуальна ідентифікація вогнищ при лапароскопії з подальшою гістологічною верифікацією, є доцільною візуальна оцінка та проведення морфометрії при експериментальній моделі ендометріозу.

На основі даних морфометрії визначали об'єми уражень, що є ще одним параметром об'єктивізації при проведенні статичних досліджень.

Зважаючи на те, що пересаджували по два клаптя власного рогу матки кожній тварині, кількість випадків, відповідно, подвоювалася стосовно кількості тварин у даній групі.

При визначенні типів уражень отримані наступні дані (рис. 4.1): у 72,5% (29 випадків) не визначено кістозних структур у місцях аутотрансплантованих імплантів (рис. 4.2) або визначено дрібні карункулярні структури без ознак розвитку (рис. 4.3), у 17,5% (7 випадків) визначено кісти з прозорим вмістом на місці імплантів (рис. 4.4), а у 10% (4 випадки) визначено кісти з мутним вмістом (рис. 4.5).

Варто зазначити, що макроскопічно, *ad oculus*, у більшості випадків, де зустрічалися кістозні структури, кісти були ненапружені, з тонкою стінкою та не визначали непрямих ознак їхнього прогресування.



Рисунок 4.1 – Типи ендометріюїдних уражень, визначені при макроскопічній оцінці при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів

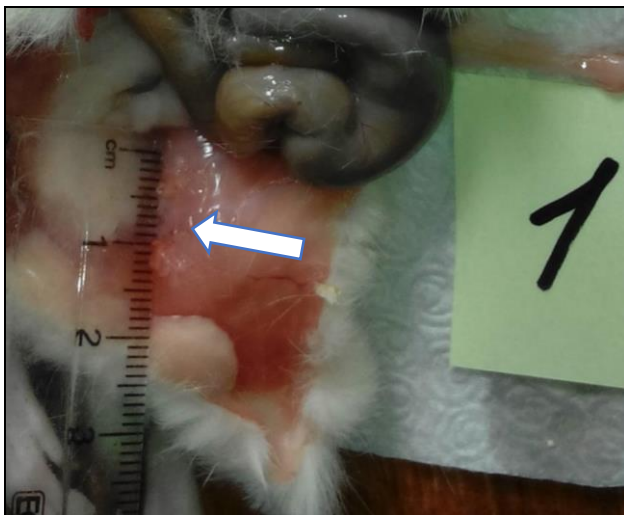


Рисунок 4.2 – На місці імплантів відсутні кістозні структури. Визначаються солідні неваскуляризовані структури. Застосування СВГ

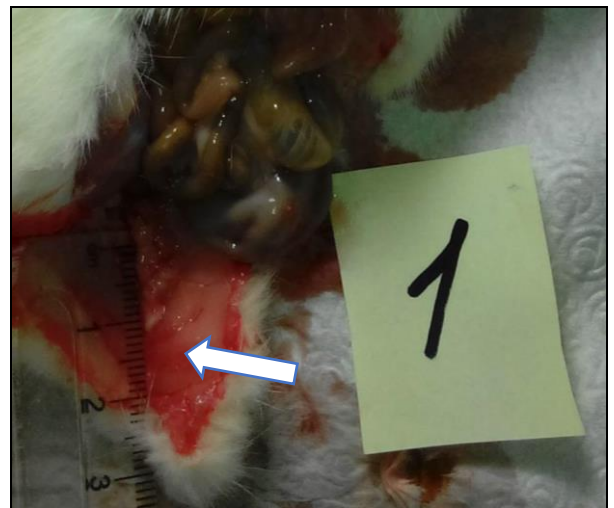


Рисунок 4.3 – На місці імплантів визначаються карункулярні структури, які не мають ознак розвитку. Застосування СВГ

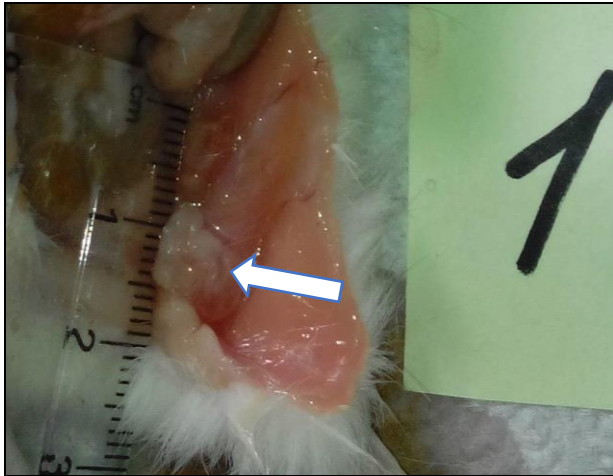


Рисунок 4.4 – На місці імплантів визначаються дрібні, прозорі кісти.  
Застосування СВГ

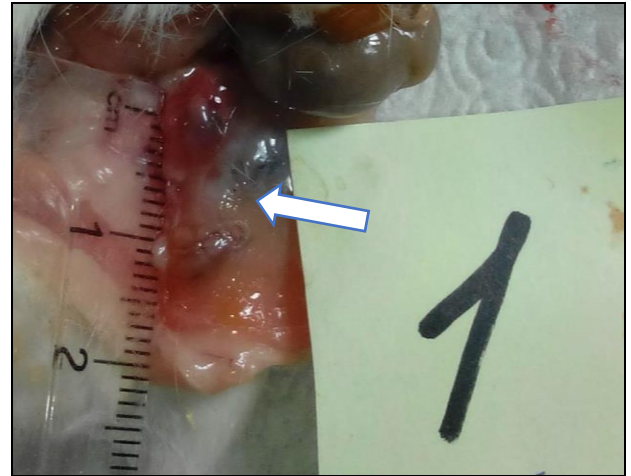


Рисунок 4.5 – На місці імплантів визначаються кісти заповнені темною рідиною. Застосування СВГ

При проведенні морфометрії у групі з експериментальним ендометріозом із застосуванням агоніста дофамінових рецепторів отримали наступні дані: середній найбільший діаметр уражень склав  $(4,69 \pm 1,9)$  мм, середній найменший діаметр уражень склав  $(3,57 \pm 1,45)$  мм.

Як можна побачити на рис. 4.6 та рис 4.7 розподіл значень найбільшого на найменшого діаметрів уражень є близьким до нормального і за виключенням кількох випадків, більшість значень належать відносно вузькому діапазону (рис. 4.8 та рис 4.9).

При проведенні тесту Манна-Уїтні для незалежних вибірок для найменшого та найбільшого діаметру уражень отримали достовірну різницю ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контрольною групою тварин.

Середній об'єм ендометріюїдних кістоподібних утворень, розрахований за модифікованою формулою напівсфери склав  $27,27 \pm 5,36$  мм<sup>3</sup>. На рис. 4.10 показаний розподіл значень об'єму кістоподібних утворень. За виключенням двох випадків, більшість значень знаходяться у відносно вузькому діапазоні.

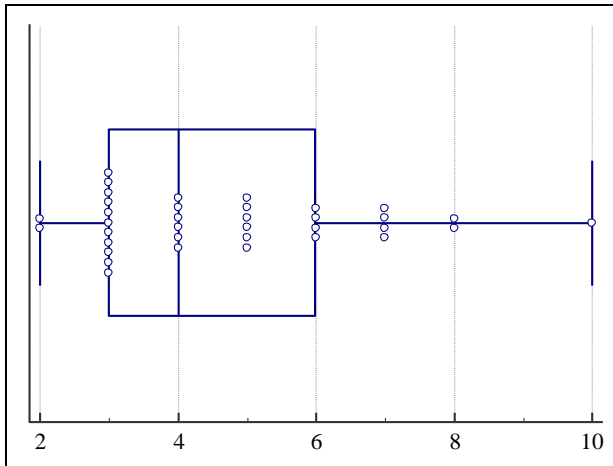


Рисунок 4.6 – Розподіл значень найбільшого діаметру уражень при застосуванні СВГ, мм

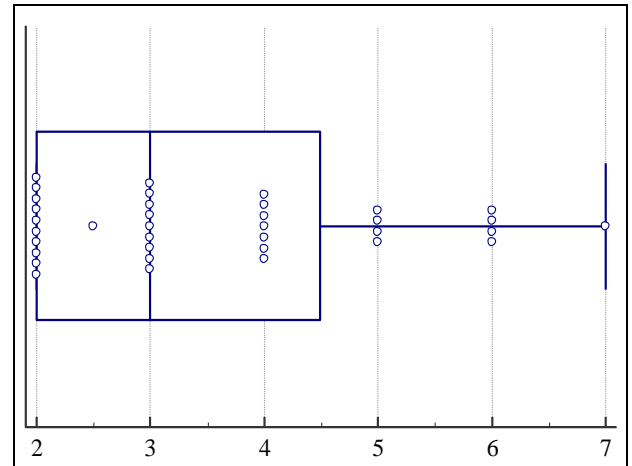


Рисунок 4.7 – Розподіл значень найменшого діаметру уражень при застосуванні СВГ, мм

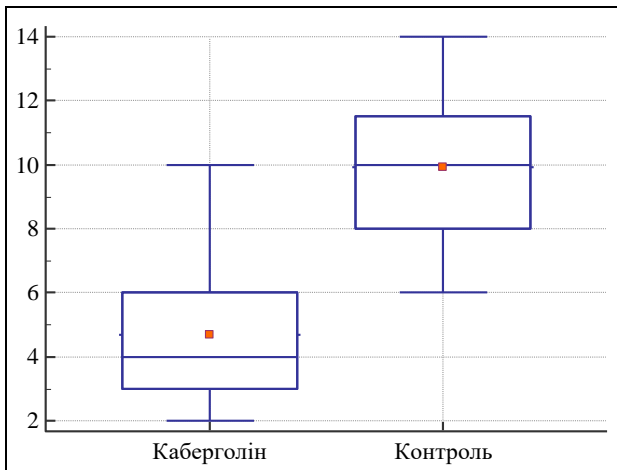


Рисунок 4.8 – Найбільший діаметр уражень порівняно із контролем, мм.  
Застосування СВГ.  $p < 0,0001$

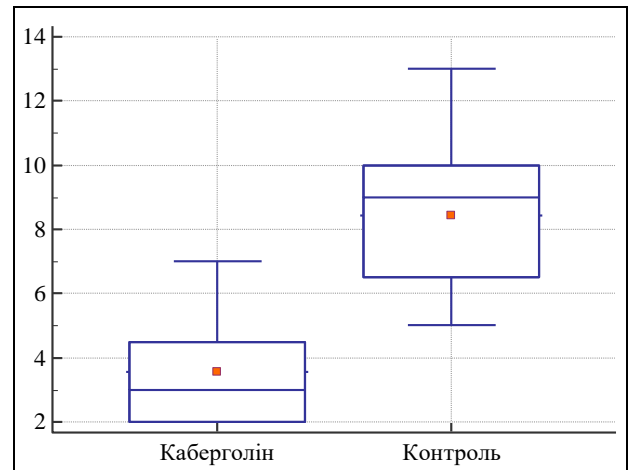


Рисунок 4.9 – Найменший діаметр уражень порівняно із контролем, мм.  
Застосування СВГ.  $p < 0,0001$

Довірчий інтервал (95%) знаходиться в межах  $16,38 \text{ мм}^3 - 38,16 \text{ мм}^3$ . Окрім зазначених двох випадків (III ступінь росту), решта зразків мають переважно 0 (5 зразків, 12,5%) та I ступінь росту (24 зразків, 60%), а рідше II ступінь (9 зразків, 22%) росту за *Queveda*.

Об'єм кістоподібних утворень при лікуванні СВГ був достовірно меншим ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контролем ( $27,27 \text{ мм}^3$  проти  $243,88 \text{ мм}^3$ ) (рис. 4.11).

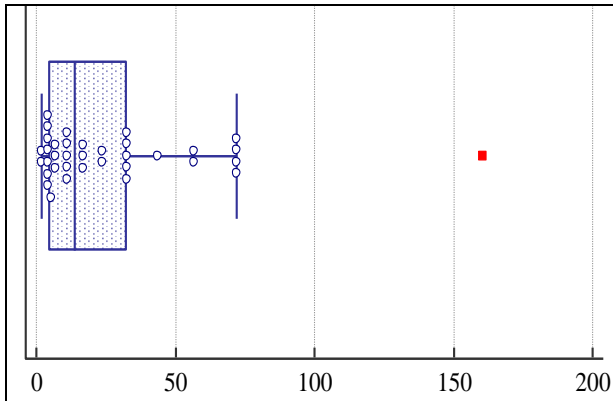


Рисунок 4.10 – Розподіл значень об'єму кістоподібних утворень у групі з застосуванням СВГ, мм<sup>3</sup>

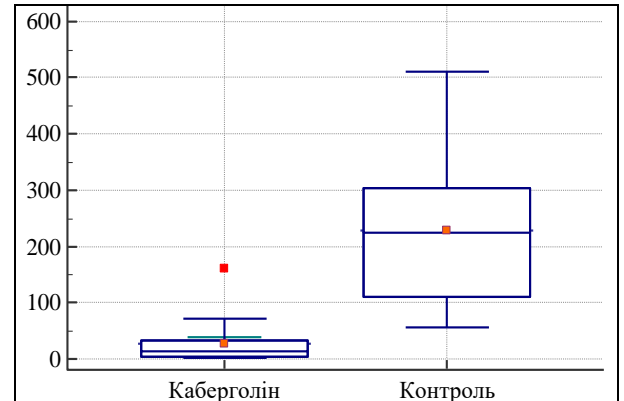


Рисунок 4.11 – Об'єм кістоподібних утворень порівняно із контролем, мм<sup>3</sup>. Застосування СВГ.  $p < 0,0001$

#### 4.1.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Забір матеріалу для гістологічного дослідження проводили одразу після макроскопічного дослідження згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.

Проведено дослідження гістологічних препаратів тканини індукованого ураження. Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному мікротомі робили гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксиліном і еозином. При мікроскопічному дослідженні ендометріюїдних уражень у групі тварин, яким застосували СВГ, спостерігали сплющений залозистий секретуючий епітелій, орієнтований секретуючим полюсом в бік порожнини кісти; нижче розташувалася цитогенна строма, яка відповідно лежала на міометральній основі (яка збереглась при трансплантації).

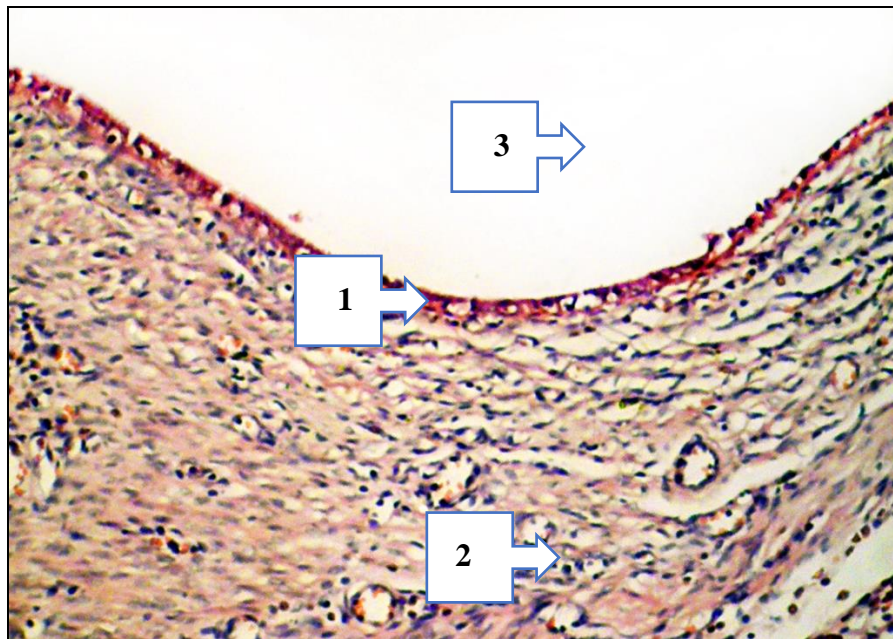


Рисунок 4.12 – Експериментальний ендометріоз. Застосування СВГ (14 днів).  
 26-ий день дослідю. 1 – залозистий епітелій, 2 – цитогенна строма, 3 –  
 порожнина кісти. Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

Задля об'єктивізації мікроскопічного дослідження та функціональної активності клітин у даній групі тварин, аналогічно іншим, використовували кілька морфометричних параметрів. Серед них: визначення висоти клітин залозистого епітелію, визначення висоти секреторної частини клітин залозистого епітелію, визначення площі ядра, проведення денситометрії ядра та клітини в цілому.

Дані морфометрії та їх статистична обробка наведені у таблиці 4.1.

При проведенні порівняльного аналізу морфометричних показників у даної групи порівняно із контрольною групою тварин, визначено, що висота епітеліоцитів (18,06 мкм проти 50,01 мкм) (рис. 4.13, рис. 4.15 та рис. 19), висота секреторного полюсу епітеліоцитів (4,83 мкм проти 16,3 мкм) (рис. 4.14, рис. 4.16 та рис. 4.20) та площа ядра (18,71 мкм<sup>2</sup> проти 76,27 мкм<sup>2</sup>) (рис. 4.17 та рис. 21) були достовірно меншими ( $p < 0,0001$ ) ніж у контрольній групі.

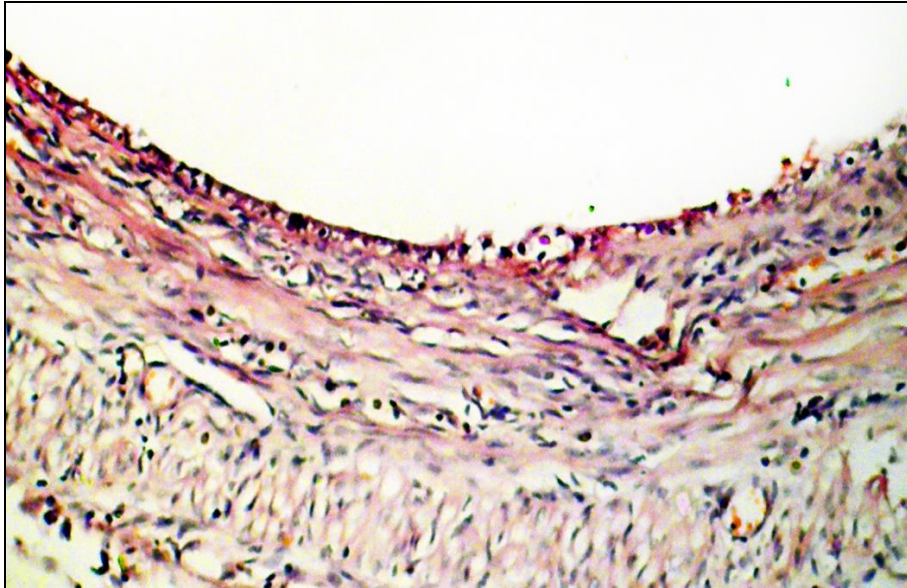


Рисунок 4.13 – Експериментальний ендометріоз. Застосування СВГ (14 днів).

26-ий день дослідю. Сплющений залозистий епітелій зі слабо вираженим секреторним полюсом та компактними ядрами.

Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

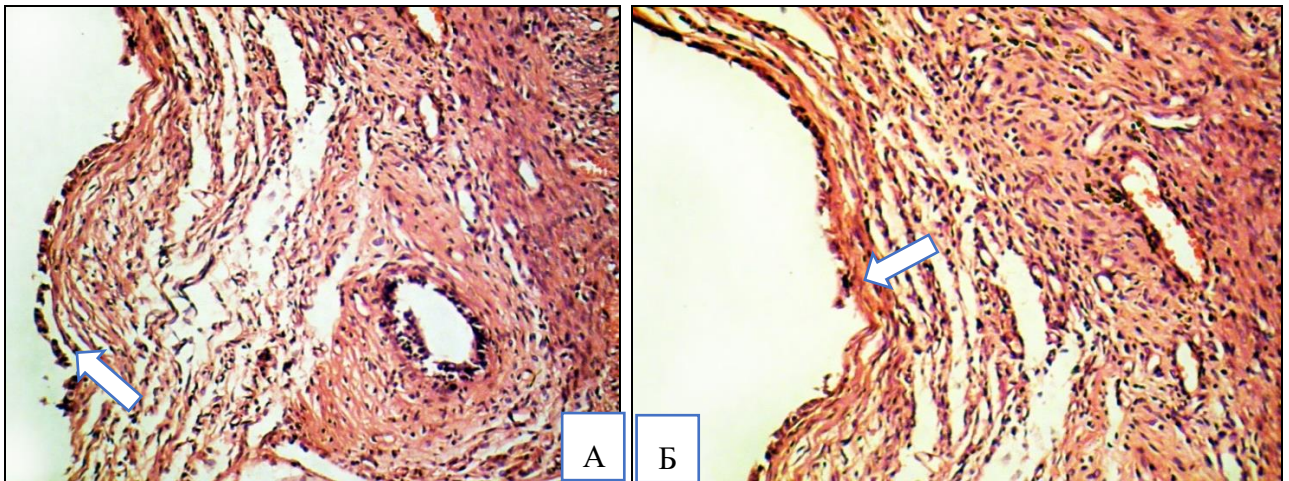


Рисунок 4.14 – Експериментальний ендометріоз. Застосування СВГ (14 днів).

26-ий день дослідю. А, Б – сплющений залозистий епітелій із ділянками обриву.

Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

Натомість, відносна щільність ядра у групі досліджу була вищою (93,65 проти 84,92) (рис. 4.18 та рис 4.22), аніж в контролі ( $p < 0,05$ ), а відносна щільність клітин відрізнялася недостовірно (110,61 проти 109,95) ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 4.1 – Основні морфометричні характеристики залозистого епітелію експериментальних ендометріодних гетеротопій у групі тварин, яким застосували CBG

| Гістологічний параметр                  | Середня | 95% ДІ середньої | Медіана | 95% ДІ медіани  | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | Кількість вимірів |
|-----------------------------------------|---------|------------------|---------|-----------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Висота клітини, мкм                     | 18,06   | 16,32 – 19,79    | 16,89   | 15,08 – 19,76   | 4,72                  | 0,84               | 71                |
| Висота секреторного полюсу клітини, мкм | 4,83    | 4,38 - 5,28      | 4,65    | 4,40 – 4,96     | 1,44                  | 1,20               | 71                |
| Площа ядра, мкм <sup>2</sup>            | 18,71   | 16,13 – 21,30    | 18,95   | 13,97 – 21,39   | 40,94                 | 6,40               | 50                |
| Відносна щільність ядра, 0-255          | 93,65   | 91,17- 96,13     | 95,00   | 92,00 – 96,00   | 37,75                 | 6,14               | 50                |
| Відносна щільність клітини, 0-255       | 110,61  | 108,02 – 113,20  | 112,00  | 109,00 – 114,00 | 6,40                  | 1,25               | 50                |

На нашу думку, зменшення розмірів епітеліоцитів та розмірів їх секреторного полюсу свідчить про їх пригнічену функціональну та секреторну



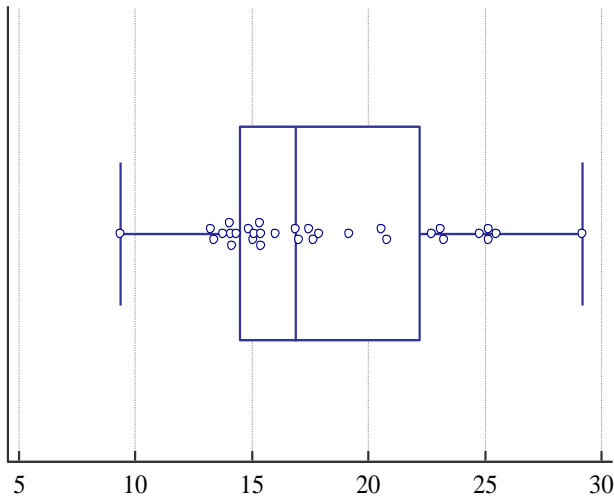


Рисунок 4.15 – Розподіл значень висоти епітелію, мкм

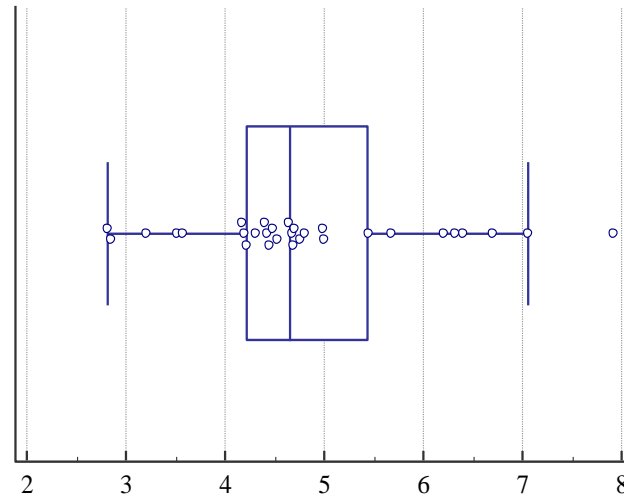


Рисунок 4.16 – Розподіл значень висоти секреторного плюсу клітини, мкм

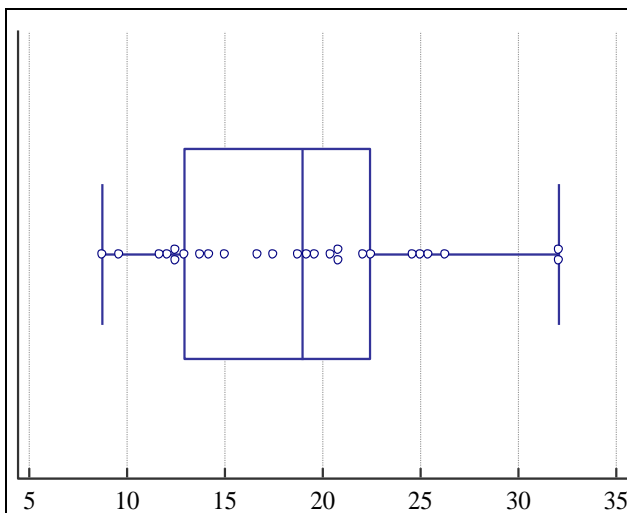


Рисунок 4.17 – Розподіл значень площі ядра епітеліоцитів, мкм<sup>2</sup>

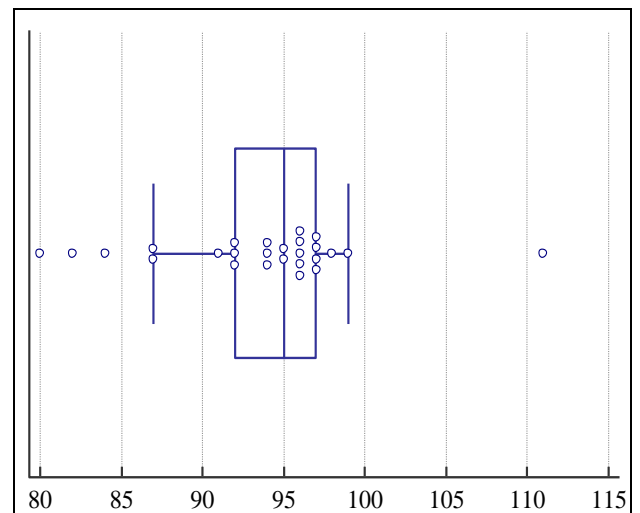


Рисунок 4.18 – Розподіл значень відносної щільності ядра, 0-255

активність. Натомість, збільшення щільності ядра у групі досліду при одночасному зменшенні його розмірів свідчить про пригнічення процесів трансляції та синтезу білків.

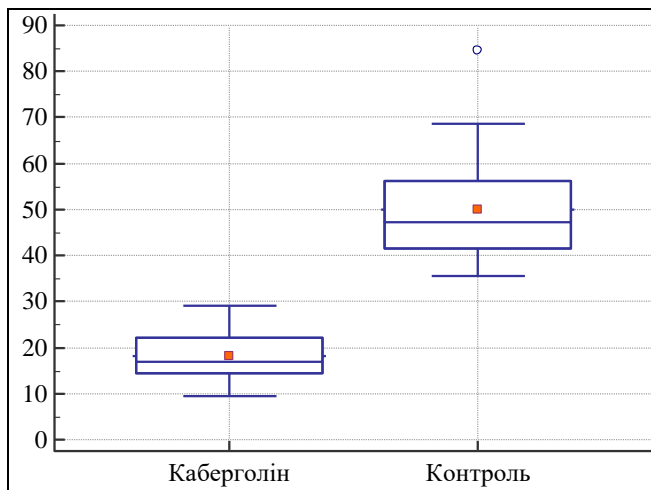


Рисунок 4.19 – Висота епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p < 0,0001$

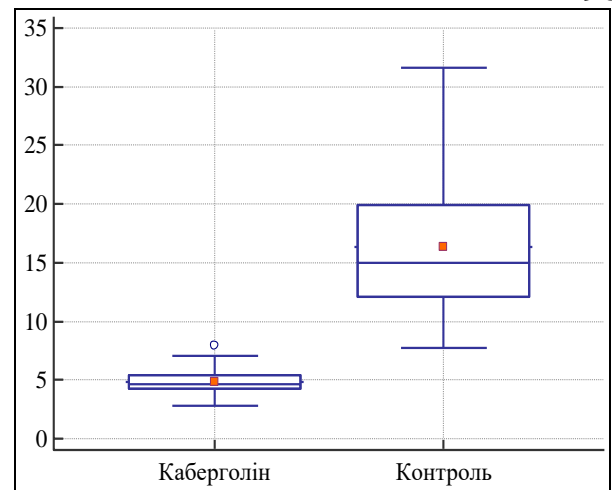


Рисунок 4.20 – Висота секреторного полюсу епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p < 0,0001$

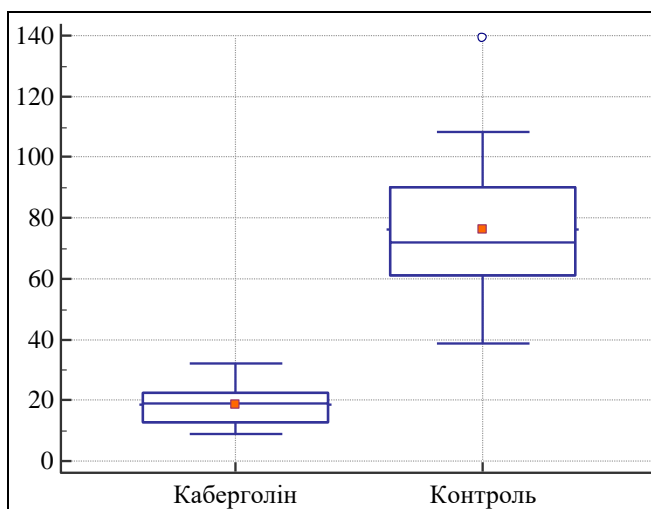


Рисунок 4.21 – Площа ядра епітеліоцитів порівняно із контролем,  $\mu\text{м}^2$ .  $P < 0,0001$

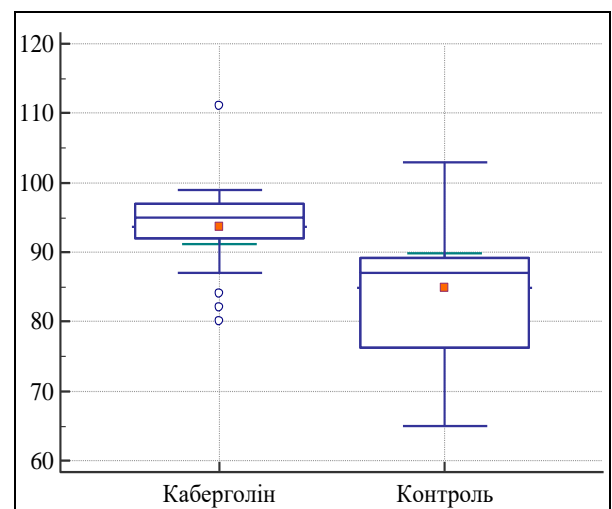


Рисунок 4.22 – Відносна густина ядра епітеліоцитів порівняно із контролем, 0-255.  $P < 0,05$

Вважаємо, що дані зміни можливо пов'язати із дією агоніста дофамінових рецепторів D2, а саме пригнічення VEGF. Порушення утворення нових кровоносних судин призводить до кисневого голодування функціонально активних клітин ендометрія транспланту, що призводить до порушення їх діяльності, а в подальшому, ймовірно, до їх апоптозу.

#### 4.1.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Після проведення оглядової мікроскопії були відібрані гістологічні мікропрепарати для кожного суб'єкту дослідження для подальшого імуногістохімічного дослідження. Імуногістохімічне дослідження з визначення концентрації MMP-2, MMP-9 та рецепторів VEGFR-2 проводилося з використанням первинних антитіл до MMP-2, MMP-9, VEGFR-2 виробництва Abcam (Кембрідж, Об'єднане Королівство). Візуалізацію первинних антитіл виконали з використанням системи детекції HRP/DAB (HRP/DAB Detection IHC kit) з використанням діамінобензенового барвника (виробництво Abcam, Кембрідж, Об'єднане Королівство). Ядра клітин були додатково зафарбовані за допомогою розчину гематоксиліну Майєра або Грота.

При визначенні MMP-2 у ектопічному ендометрії у контрольній групі з експериментальним ендометріозом встановили, що ділянки з позитивним зафарбовуванням були розташовані переважно в епітелію, субепітеліальній ділянці та у нижчерозташованій стромі й навколо судин. Інтенсивність забарвлення зростала згідно градієнту вглиб стромі (рис. 4.23).

Визначення експресії MMP-2 в ектопічному ендометрії в групі із застосуванням виявило суттєве візуальне зниження експресії у субепітеліальних ділянках. Помітне зниження експресії MMP-2 виявили і в стромі, однак повної атенуації не відбулося (рис. 4.24).

При проведенні об'єктивізації даних імуногістохімічного дослідження за допомогою програмного забезпечення ImageJ разом з IHC Profiler у дослідній групі визначили достовірно менші значення оптичної густини ІГХ –  $1,7158 \pm 0,27$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,0003$ ) (рис. 4.25).

Експресія MMP-9 у ектопічному ендометрії контрольної групи мала наступну закономірність: виражена активність у епітеліальних клітинах, однак у субепітеліальному шарі визначили мінімальна активність та подальше її збільшення у стромі (рис. 4.26).

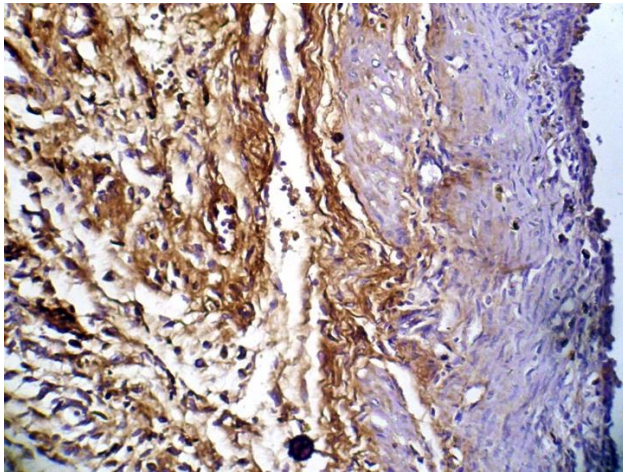


Рисунок 4.23 – MMP-2 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

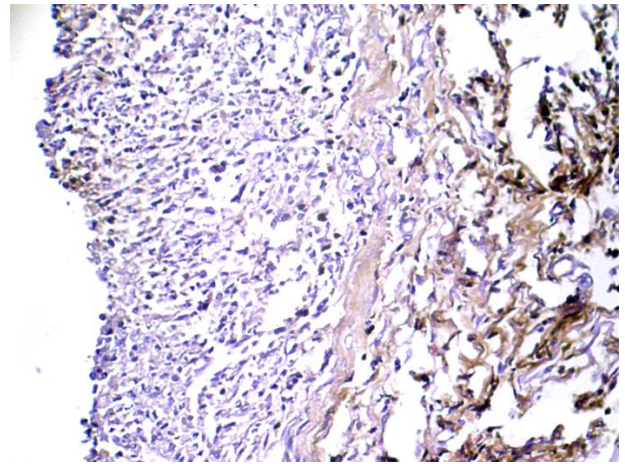


Рисунок 4.24 – MMP-2 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

У дослідній групі при застосуванні СВГ (рис. 4.27) активність MMP-9 у епітеліальному шарі була відсутня, а у стромі спостерігали помітне зниження активності. Оптична щільність ІГХ складала  $1,8763 \pm 0,20$  проти  $2,1850 \pm 0,3145$  (при  $p = 0,0013$ ) (рис. 4.28).

При визначенні експресії VEGFR-2 у контрольній групі при експериментальному ендометріозі нами були виявлені групи позитивно зафарбованих клітин з певною закономірністю – вони розташувалися в товщі стінок капілярів, в капілярному просторі або в міжклітинному просторі в місцях ймовірного ангіонеогенезу (судячи з кількості мігрованих клітин у вказаних ділянках) (рис. 4.29 та рис 4.30).

Натомість, у дослідній групі при використанні СВГ спостерігали переважно повну відсутність позитивних VEGFR-2 клітин і лише у 2-х гістологічних зрізах виявили по одній VEGFR-2 позитивній клітині (що є свідченням валідності проведеного дослідження).

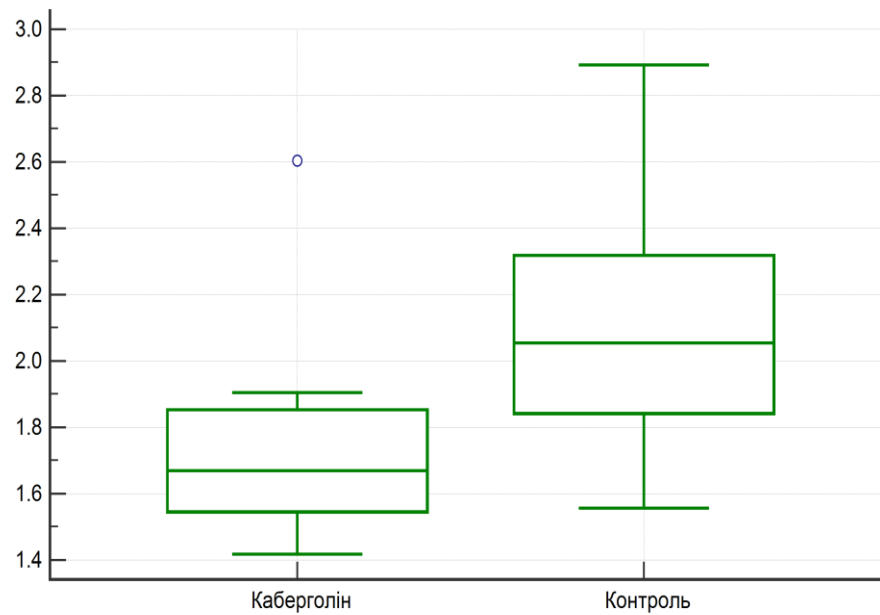


Рисунок 4.25 – Оптична щільність ІГХ MMP-2 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,001$ )

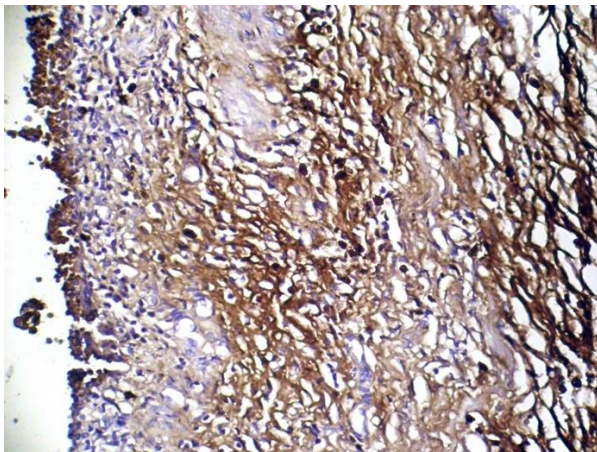


Рисунок 4.26 – MMP-9 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

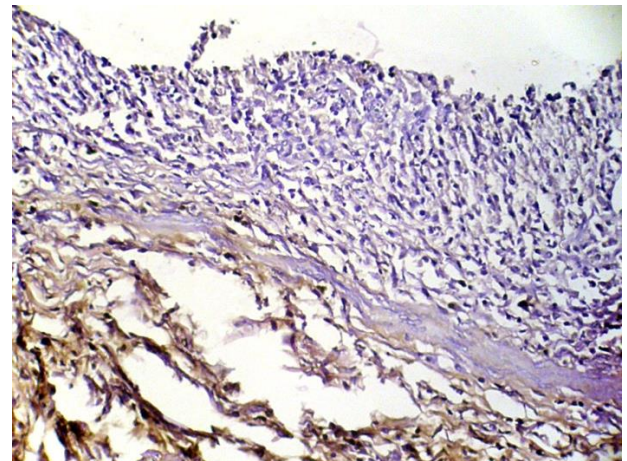


Рис 4.27 – MMP-9 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

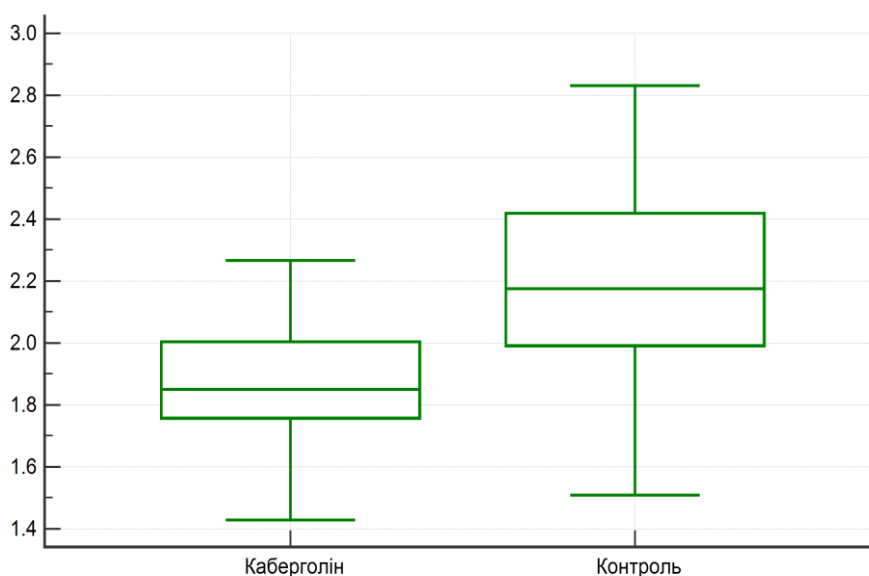


Рисунок 4.28 – Оптична щільність ІГХ MMP-9 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,001$ )

Об'єктивізацію отриманих даних імуногістохімії проводили шляхом ручного підрахунку позитивних клітин у кожному гістологічному препараті. Отримали наступні дані (рис. 4.31):  $0,11 \pm 0,32$  позитивних клітин у дослідній групі (при застосуванні СВГ) проти  $9,79 \pm 3,29$  позитивних клітин у контрольній групі ( $p < 0,0001$ ) [257].

### Висновки до підрозділу:

Таким чином, застосування нами СВГ при експериментальному ендометріозі у щурів дозволило зробити наступні висновки:

1. Застосування СВГ у щурів із індукованим експериментальним ендометріозом у дозі  $0,03$  мг/кг маси тіла протягом 14 днів та через 7 днів після індукції, призвело до достовірного зменшення утворення кістоподібних утворень на місці імплантів.
2. Застосування СВГ у зазначеній дозі призвело до достовірного зменшення макроскопічних розмірів та об'єму уражень порівняно із контролем.

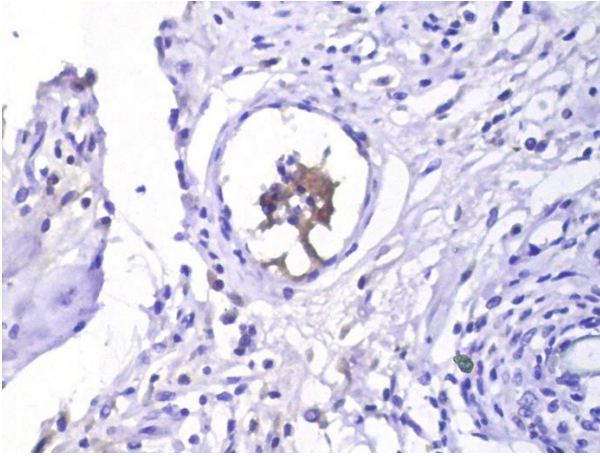


Рисунок 4.29 – VEGFR-2 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до VEGFR-2. Об. $40^x$ , Ок.  $10^x$

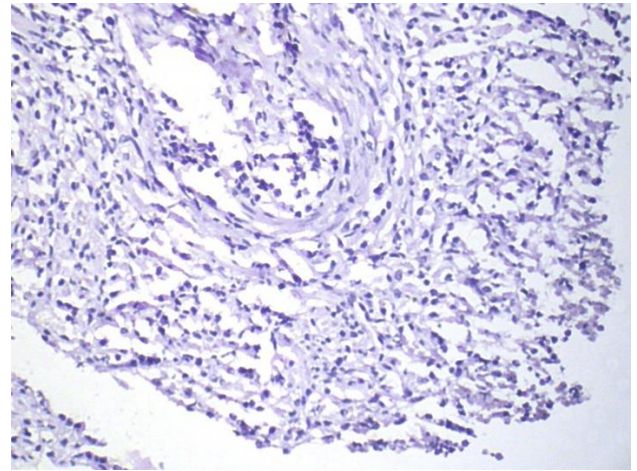


Рисунок 4.30 – VEGFR-2 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до VEGFR-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

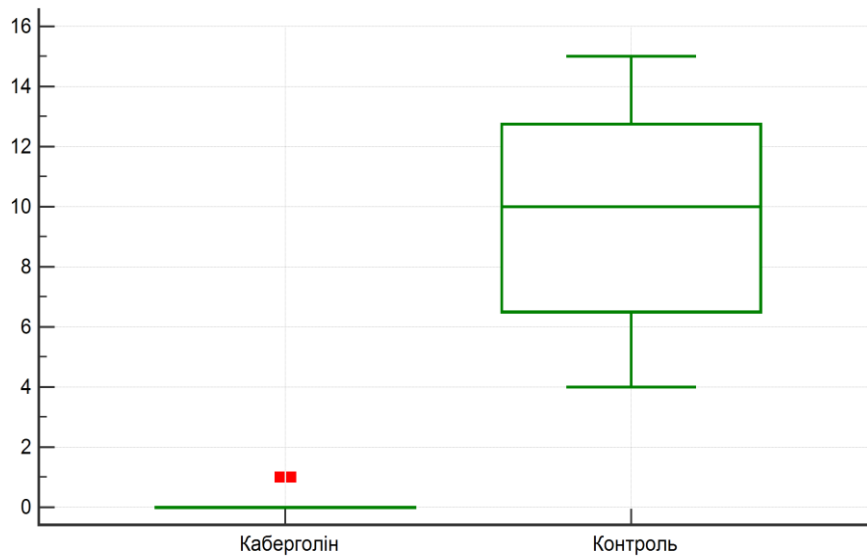


Рисунок 4.31 – Відносна кількість імуно-позитивних VEGFR-2 клітин ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,001$ )

3. Застосування CBG призвело до достовірної гістологічної регресії із зменшенням розмірів епітеліоцитів, їх функціонального (секреторного) полюсу та компактизацією ядра.

4. У дослідній групі при проведенні імуногістохімії виявили достовірно меншу експресію MMP-2 ( $1,7158 \pm 0,27$  проти  $2,08 \pm 0,31$ ,  $p = 0,0003$ ) та MMP-9 ( $1,8763 \pm 0,20$  проти  $2,1850 \pm 0,3145$ ,  $p = 0,0013$ ). Експресія VEGFR-2 у контрольній групі проявлялася у вигляді позитивно зафарбованих клітин з певною закономірністю, натомість у дослідній групі при використанні CBG спостерігали переважно повну відсутність імуно-позитивних VEGFR-2 клітин ( $0,11 \pm 0,32$  проти  $9,79 \pm 3,29$ ,  $p < 0,0001$ ).

4.2 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів та високо-селективного інгібітора ЦОГ-2

Дана група дослідження складалася з 19-ти особин дорослих самок білих щурів, які ще не народжували, вагою 165-205 г.

Перед проведенням оперативного втручання для індукції експериментальної моделі ендометріозу нами було проведено 2-ох разове уведення естрадіолу валерату у подвійній підтримуючій дозі (0,06 мг/кг) через день, двічі – на 1-ий та 3-ій день досліду, а на 4-ий проводили оперативне втручання.

Після проведення оперативного втручання щурам вводили підтримуючу дозу естрадіолу валерату (0,03 мг/кг) щодня підшкірно в ділянці спини. Це є необхідним у зв'язку з виконанням оваріектомії, що дозволило усунути можливі зміни у подальшому та різницю у гормональному фоні у різних особин.



Окрім естрогенової підтримки, у даній групі тварин також застосовували агоніст дофамінових рецепторів (СВГ) у вигляді підшкірних ін'єкцій у дозі 0,075 мг/кг маси тіла тварини та високоселективний інгібітор ЦОГ-2 (іСОХ) у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини щоденно.

#### 4.2.1 Макроскопічне дослідження ендометріюдних вогнищ

Макроскопічне дослідження ендометріюдних вогнищ проводили одразу після евтаназії, після розкриття черевної порожнини щура П-подібним розрізом.

Враховуючи той факт, що наразі єдиним достовірним методом діагностики ендометріозу є візуальна ідентифікація вогнищ при лапароскопії з подальшою гістологічною верифікацією, є доцільною візуальна оцінка та проведення морфометрії при експериментальній моделі ендометріозу.

На основі даних морфометрії визначали об'єми уражень, що є ще одним з параметрів об'єктивізації при проведенні статичних досліджень.

Зважаючи на те, що пересаджували по два клаптя власного рогу матки кожній тварині, кількість спостережуваних випадків, відповідно, подвоювалася стосовно кількості тварин у даній групі.

При визначенні типів уражень отримані наступні дані (рис. 4.32): у 52,63% випадків (20 аутоотрансплантованих клаптів) визначено кістозні структури зі світлим або прозорим вмістом (рис. 4.33), у 26,3% (10 аутоотрансплантованих клаптів) – визначено кістозні структури з темним вмістом (рис. 4.34), у 21,05% (8 аутоотрансплантованих клаптів) – не визначено кістозних структур, проте виявлено ознаки ураження очеревини (гіперемія та набряк) (рис. 4.35, рис. 4.36).



Рисунок 4.32 – Типи ендометріюїдних уражень, визначені при макроскопічній оцінці при комплексному застосуванні агоніста дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітора ЦОГ-2

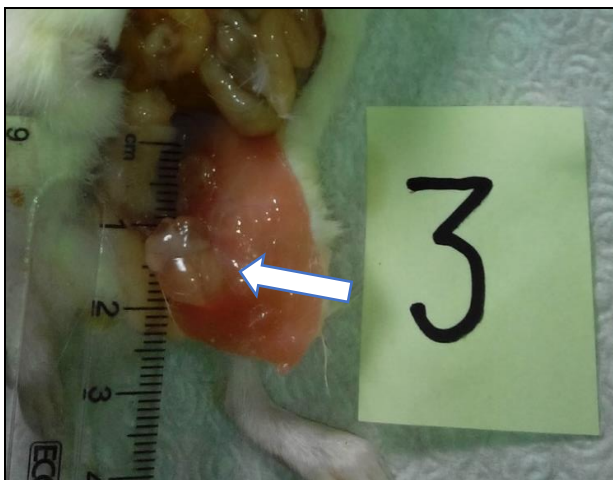


Рисунок 4.33 – На місці імплантів визначаються дрібні прозорі кісти. Комплексне лікування СВГ та іСОХ

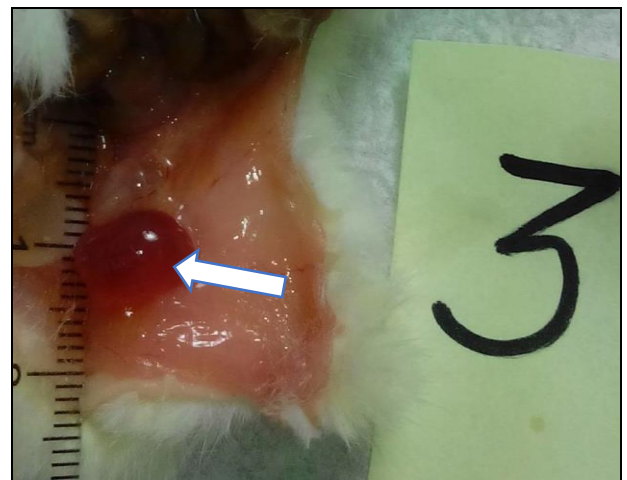


Рисунок 4.34 – На місці імплантів визначаються кісти, заповнені темною рідиною. Комплексне лікування СВГ та іСОХ

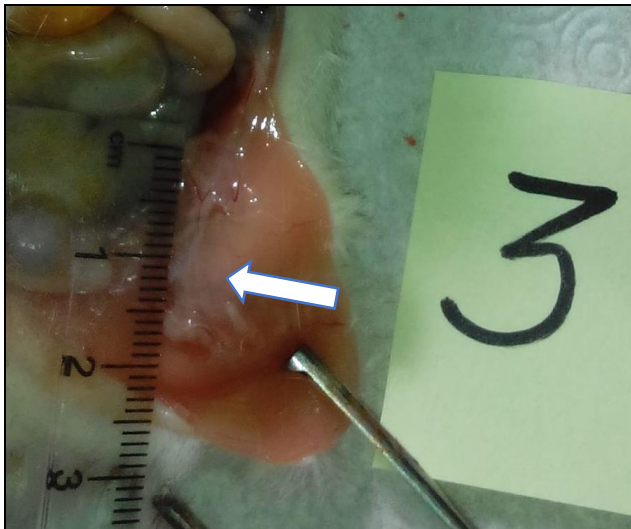


Рисунок 4.35 – На місці імплантів відсутні кістозні структури.

Визначаються солідні неваскуляризовані структури.

Комплексне лікування CBG та iCOX

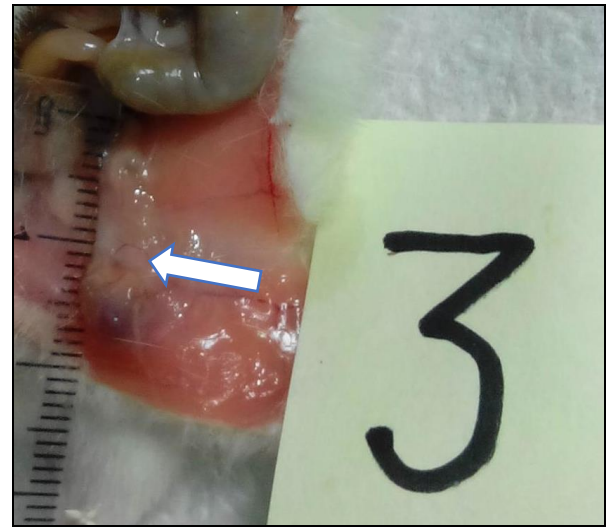


Рисунок 4.36 – На місці імплантів визначаються карункулярні структури, які не мають ознак розвитку.

Комплексне лікування CBG та iCOX

При проведенні морфометрії у групі з експериментальним ендометріозом із застосуванням у комплексі дофамінових рецепторів CBG та високоселективного інгібітора ЦОГ-2 iCOX отримали наступні дані: середній найбільший діаметр уражень склав  $6,67 \pm 2,32$ мм, середній найменший діаметр уражень склав  $5,15 \pm 1,78$ мм.

Як можна побачити на рис 4.37 та рис 4.38 розподіл значень найбільшого на найменшого діаметрів уражень має близький до нормального розподіл і за виключенням кількох випадків більшість їх належать відносно вузькому діапазону значень.

При проведенні тесту Манна-Уїтні для незалежних вибірок для найменшого та найбільшого діаметру уражень отримали достовірну різницю ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контрольною групою тварин (рис. 4.39 та рис. 40).

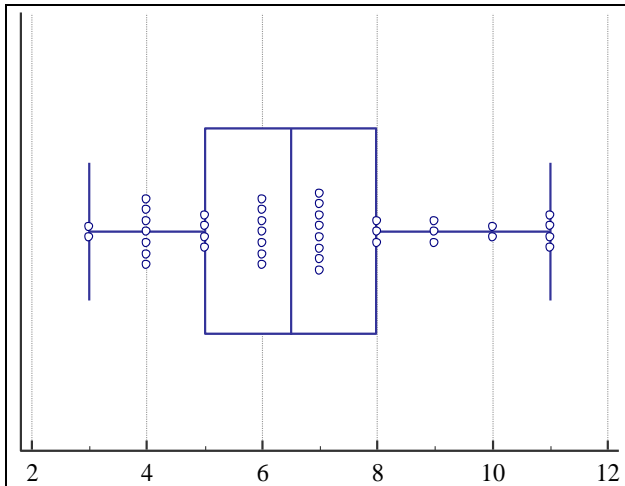


Рисунок 4.37 – Розподіл значень найбільшого діаметру уражень при комплексному застосуванні СВГ та iCOX, мм

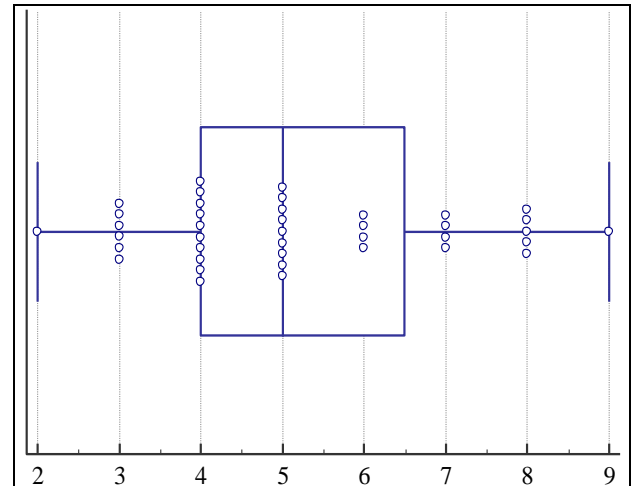


Рисунок 4.38 – Розподіл значень найменшого діаметру уражень при комплексному застосуванні СВГ та iCOX, мм

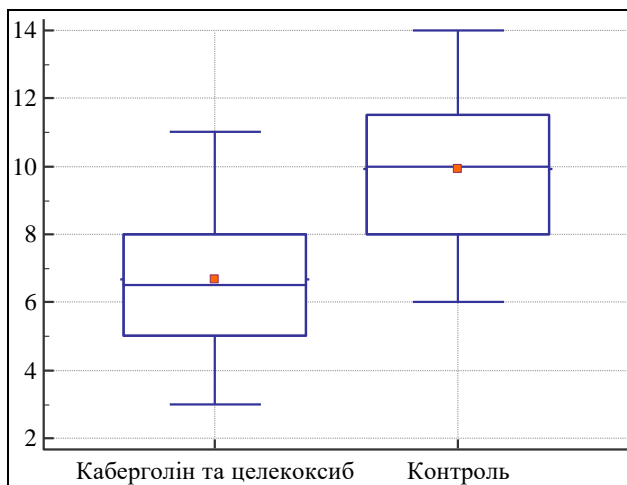


Рисунок 4.39 – Найбільший діаметр уражень порівняно із контролем, мм. Комплексне застосування СВГ та iCOX.  $p < 0,0001$

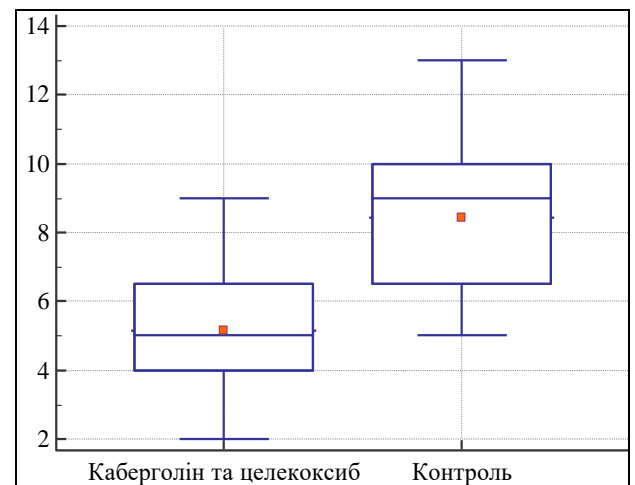


Рисунок 4.40 – Найменший діаметр уражень порівняно із контролем, мм. Комплексне застосування СВГ та iCOX.  $p < 0,0001$

Середній об'єм ендометріюїдних кістоподібних утворень, розрахований за модифікованою формулою напівсфери, склав  $71,10 \pm 10,14 \text{ мм}^3$ . На рис. 4.41 показаний розподіл значень об'єму кістоподібних утворень. Довірчий інтервал

знаходиться в межах  $50,59 \text{ мм}^3$  -  $91,61 \text{ мм}^3$ . 10 випадків ектопій (21,05%) мали III ступінь росту, 10 випадків (21,05%) – I ступінь росту за Quereda, решта випадків – II ступінь.

Об'єм кістоподібних утворень при лікуванні CBG та iCOX був достовірно меншим ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контролем ( $50,02 \text{ мм}^3$  проти  $243,88 \text{ мм}^3$ ) (рис. 4.42).

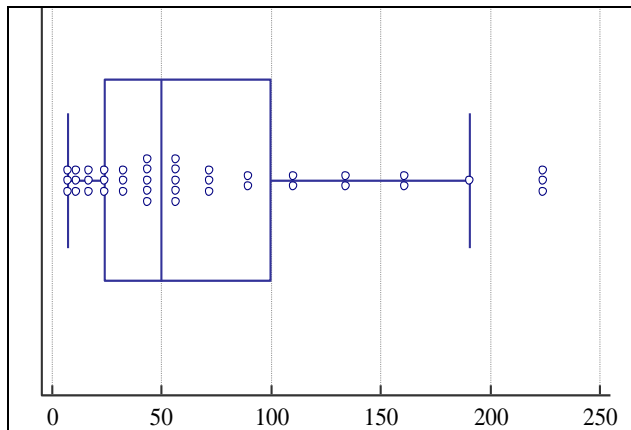


Рисунок 4.41 – Розподіл значень об'єму кістоподібних утворень у групі з комплексним застосуванням CBG та iCOX,  $\text{мм}^3$

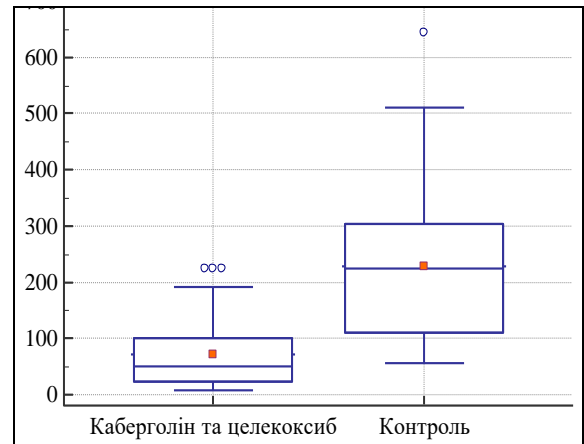


Рисунок 4.42 – Об'єм кістоподібних утворень порівняно із контролем,  $\text{мм}^3$ . Застосування CBG та iCOX.  $p < 0,0001$

#### 4.2.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Забір матеріалу для гістологічного дослідження проводили одразу після макроскопічного дослідження згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.

Проведено дослідження гістологічних препаратів тканини індукованого ураження. Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному

мікротомі робили гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксиліном і еозином.

При мікроскопічному дослідженні ендометріюдних уражень в групі тварин, у яких застосували комплексно СВГ та іСОХ, спостерігали залозистий секретуючий епітелій з ознаками десквамації, орієнтований секретуючим полюсом в бік порожнини кісти; нижче розташувалася цитогенна строма та міометральна основа (рис.4.43, рис.4.44).

Задля об'єктивізації мікроскопічного дослідження та функціональної активності клітин у даній групі тварин, аналогічно іншим, використовували кілька морфометричних параметрів. Серед них: визначення висоти клітин залозистого епітелію, визначення висоти секреторної частини клітин залозистого епітелію, визначення площі ядра, проведення денситометрії ядра та клітини в цілому.

Дані морфометрії та їх статистична обробка наведені у таблиці 4.2.

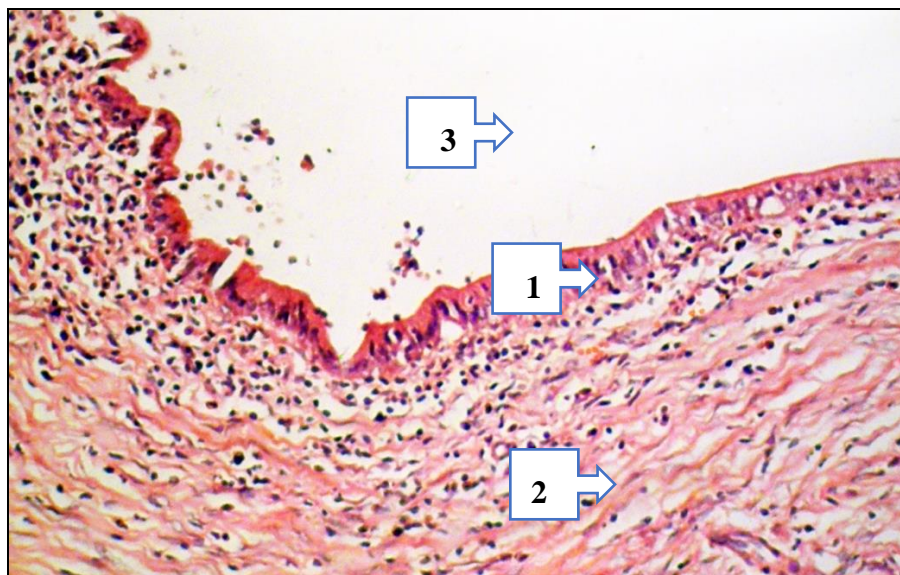


Рисунок 4.43 – Експериментальний ендометріоз. Комплексне застосування СВГ та іСОХ (14 днів). 26-ий день досліду. 1 – залозистий епітелій, 2 – цитогенна строма, 3 – порожнина кісти. Гематоксилін і еозин. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

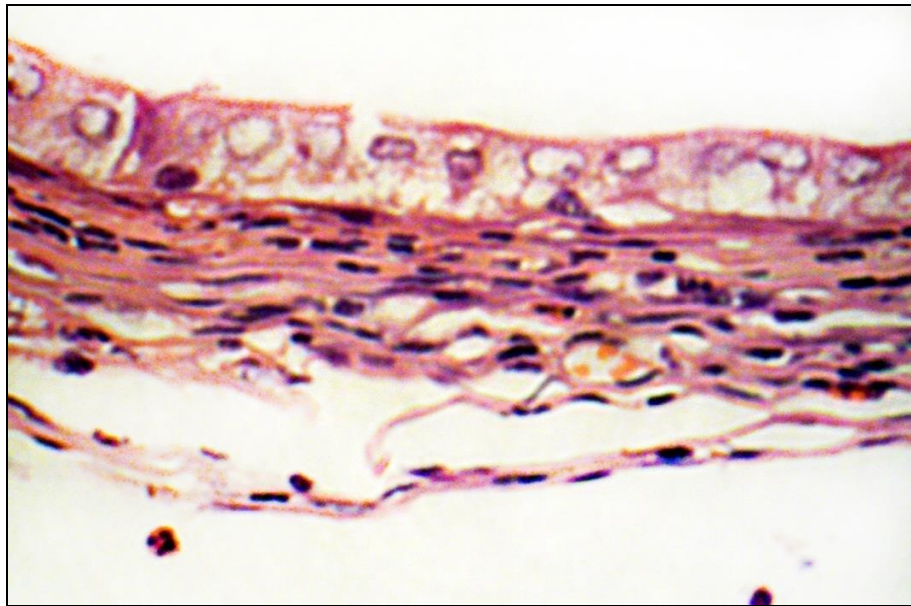


Рисунок 4.44 – Експериментальний ендометріоз. Комплексне застосування СВГ та іСОХ (14 днів). 26-ий день дослідю. Гематоксилін і еозин.

Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

При проведенні порівняльного аналізу морфометричних показників у даної групи порівняно із контрольною групою тварин, визначено, що висота епітеліоцитів (44,69 мкм проти 50,01 мкм,  $p > 0,05$ ) достовірно не відрізнялася (рис. 4.45 та рис. 4.49), висота секреторного полюсу епітеліоцитів (23,11 мкм проти 16,3 мкм,  $p < 0,0001$ ) (рис. 4.46 та рис. 4.50) була достовірно вищою ніж у контрольній групі, площа ядра (13,12 мкм<sup>2</sup> проти 76,27 мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ) (рис. 4.47 та рис. 4.51) була достовірно меншою ( $p < 0,0001$ ) ніж у контрольній групі.

Натомість, відносна щільність ядра у групі дослідю була вищою (93,65 проти 84,92) (рис. 4.48 та рис. 4.52) чим в контролі ( $p < 0,05$ ), а відносна щільність клітин відрізнялася (114,55 проти 109,95) недостовірно ( $p > 0,05$ ).

На нашу думку, зменшення розмірів епітеліоцитів свідчить про їх пригнічену функціональну та секреторну активність. Натомість, збільшення щільності ядра у групі дослідю при одночасному зменшенні його розмірів свідчить про пригнічення процесів трансляції та синтезу білків. Проте збільшення розмірів їх секреторного полюсу може свідчити про запізнiле

пригнічення їх діяльності або ж про неповне пригнічення функціональної активності.

Вважаємо, що дані зміни можливо пов'язати із дією агоніста дофамінових рецепторів D2, а також високоселективного інгібітора ЦОГ-2, а саме пригнічення VEGF та VEGF-альтернативних шляхів ангиогенезу. Отримання дещо суперечливих даних (збільшення секреторного полюсу поряд зі зменшенням розміру клітин) може свідчити про неповне пригнічення їхньої функціональної активності.

Таблиця 4.2 – Основні морфометричні характеристики залозистого епітелію експериментальних ендометріюїдних гетеротопій у групі тварин, яким застосували у комплексі CBG та iCOX

| Гістологічний параметр                  | Середня | 95% Ді середньої  | Медіана | 95% Ді медіани    | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | Кількість вимірів |
|-----------------------------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Висота клітини, мкм                     | 44,69   | 42,02-<br>47,35   | 46,18   | 39,05-<br>50,23   | 6,45                  | 1,29               | 50                |
| Висота секреторного полюсу клітини, мкм | 23,11   | 22,52 -<br>23,71  | 23,00   | 22,33-<br>14,07   | 1,37                  | 0,28               | 50                |
| Площа ядра, мкм <sup>2</sup>            | 13,13   | 12,45-<br>13,80   | 13,63   | 11,79-<br>14,00   | 1,39                  | 0,32               | 40                |
| Відносна щільність ядра, 0-255          | 95,55   | 94,86-<br>96,23   | 95,00   | 95,00-<br>96,00   | 1,46                  | 0,32               | 40                |
| Відносна щільність клітини, 0-255       | 114,5   | 112,30-<br>116,79 | 114,50  | 112,00-<br>117,83 | 4,79                  | 1,07               | 40                |



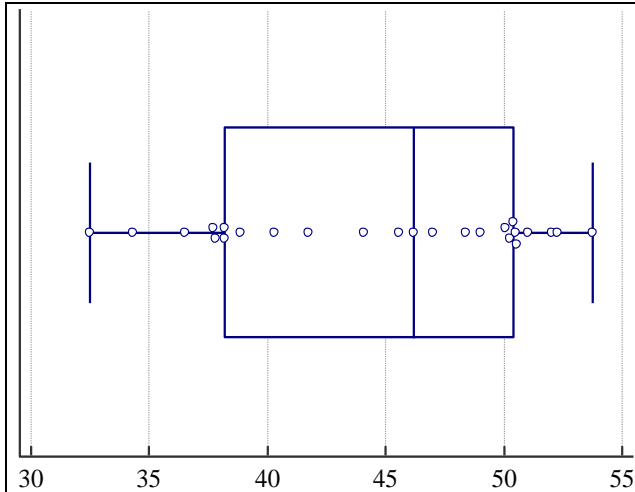


Рисунок 4.45 – Застосування СВГ та  
iCOX

Розподіл значень висоти епітелію, мкм

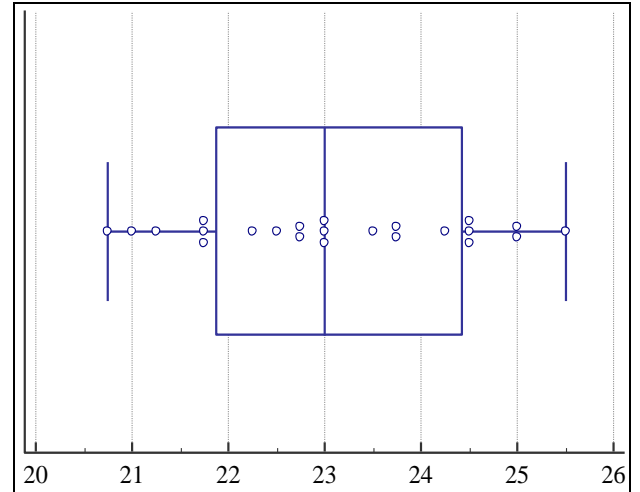


Рисунок 4.46 – Застосування СВГ та  
iCOX

Розподіл значень висоти секреторного  
плюсу клітини, мкм

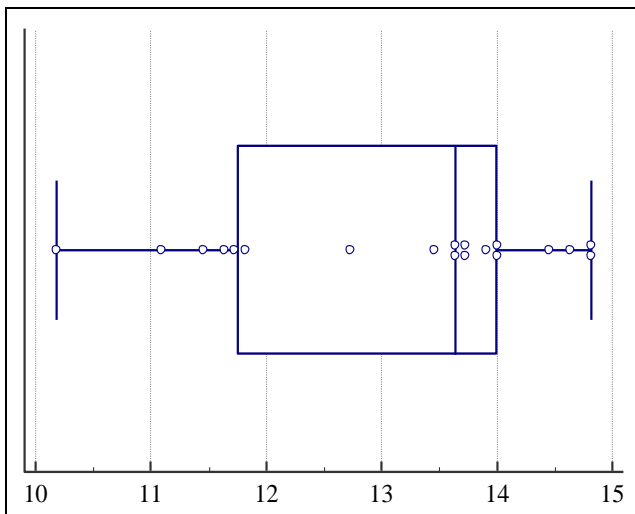


Рисунок 4.47 – Застосування СВГ та  
iCOX. Розподіл значень площі ядра  
епітеліоцитів, мкм<sup>2</sup>

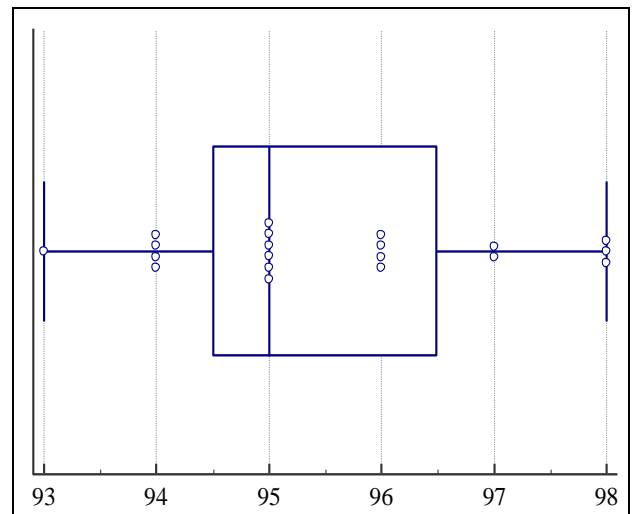


Рисунок 4.48 – Застосування СВГ та  
iCOX. Розподіл значень відносної  
щільності ядра, 0-255

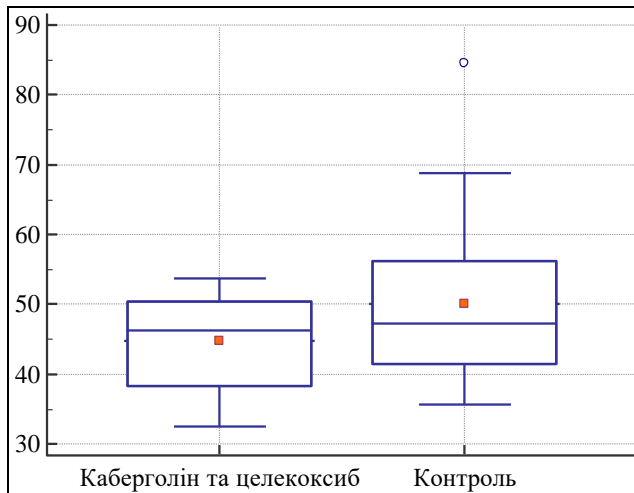


Рисунок 4.49 – Застосування СВГ та іСОХ. Висота епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p > 0,05$

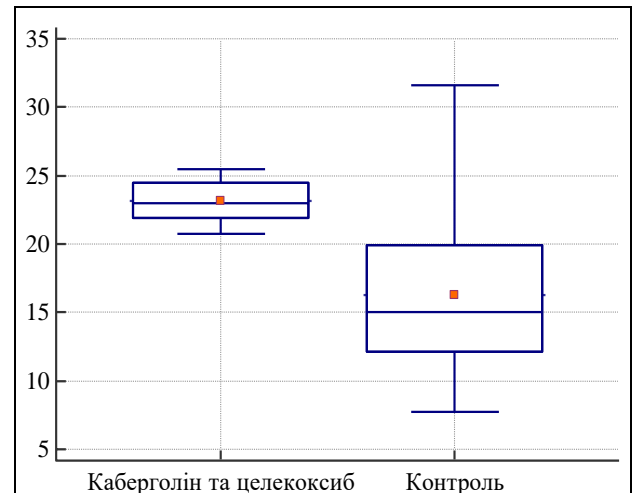


Рисунок 4.50 – Застосування СВГ та іСОХ. Висота секреторного полюсу епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p < 0,0001$

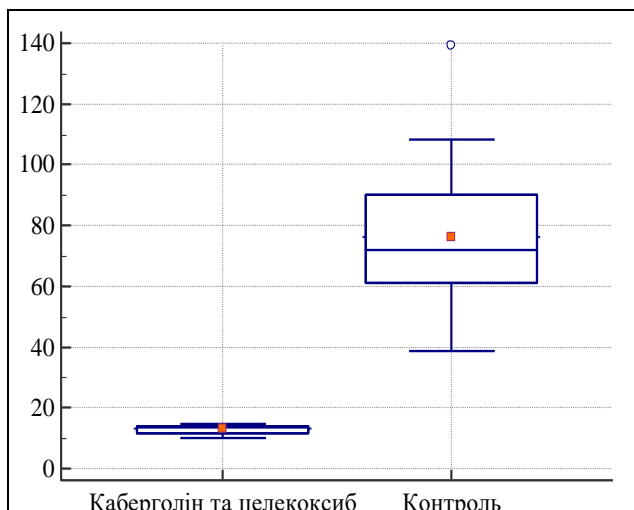


Рисунок 4.51 – Застосування СВГ та іСОХ. Площа ядра епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм<sup>2</sup>.  $p < 0,0001$

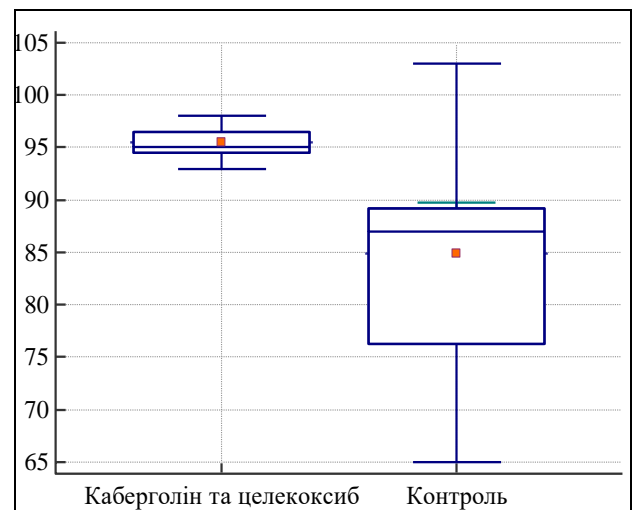


Рисунок 4.52 – Застосування СВГ та іСОХ. Відносна густина ядра епітеліоцитів порівняно із контролем, 0-255.  $p < 0,05$

#### 4.2.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріїдних вогнищ

Після мікроскопічної оцінки були відібрані найбільш репрезентативні гістологічні мікропрепарати для кожного суб'єкту дослідження для подальшого

імуногістохімічного дослідження. Імуногістохімічне дослідження з визначення концентрації MMP-2, MMP-9 та рецепторів VEGFR-2 проводилося з використанням первинних антитіл до MMP-2, MMP-9, VEGFR-2 виробництва Abscam та системи детекції HRP/DAB (HRP/DAB Detection IHC kit) з використанням діамінобензенового барвника (виробництво Abscam, Кембрідж, Об'єднане Королівство). Ядра клітин були додатково зафарбовані за допомогою розчину гематоксиліну Майєра або Грота.

При визначенні MMP-2 у ектопічному ендометрії у контрольній групі з експериментальним ендометріозом встановили, що найбільша інтенсивність спостерігалася у епітелію, у субепітеліальній ділянці та у стромі й навколо судин. Інтенсивність забарвлення зростала згідно градієнту вглиб стромі (рис. 4.53).

Визначення експресії MMP-2 в ектопічному ендометрії в групі із застосуванням CBG та iCOX виявило суттєве візуальне зниження експресії у епітеліальних та субепітеліальних ділянках. Помітне зниження експресії MMP-2 виявили і в стромі. Окремі, незначні фрагменти стромі все ще зберегли певну експресію (рис. 4.54).

При проведенні об'єктивізації даних імуногістохімічного дослідження за допомогою програмного забезпечення ImageJ в комплексі з IHC Profiler у дослідній групі визначили достовірно менші значення оптичної густини ІГХ –  $1,617 \pm 0,18$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,0001$ ) (рис. 4.55).

Експресія MMP-9 у ектопічному ендометрії контрольної групи мала наступну закономірність: виражена активність у епітеліальних клітинах, у субепітеліальному шарі, нижче, зазвичай, розташувалася смуга стромі з мінімальною активністю, а далі розташувалася виражено позитивна цитогенна строма (рис 4.56). У дослідній групі при застосуванні CBG та iCOX (рис. 4.57) активність MMP-9 у епітеліальному та субепітеліальному шарі була відсутня, а у стромі спостерігали помітне зниження активності з наявністю окремих

позитивних острівців. Оптична щільність ІГХ складала  $1,595 \pm 0,23$  проти  $2,185 \pm 0,3145$  (при  $p = 0,0001$ ) (рис. 4.58).

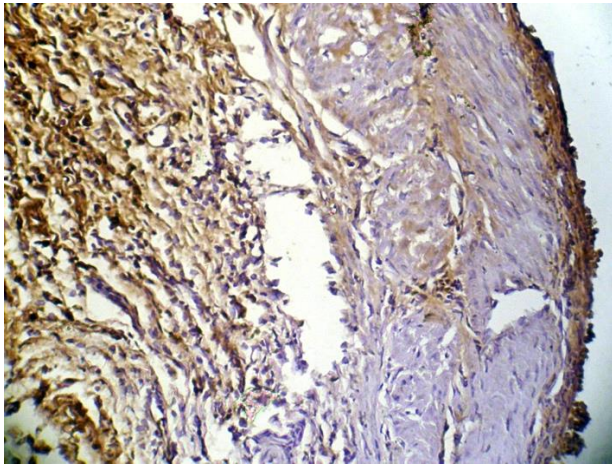


Рисунок 4.53 – MMP-2 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

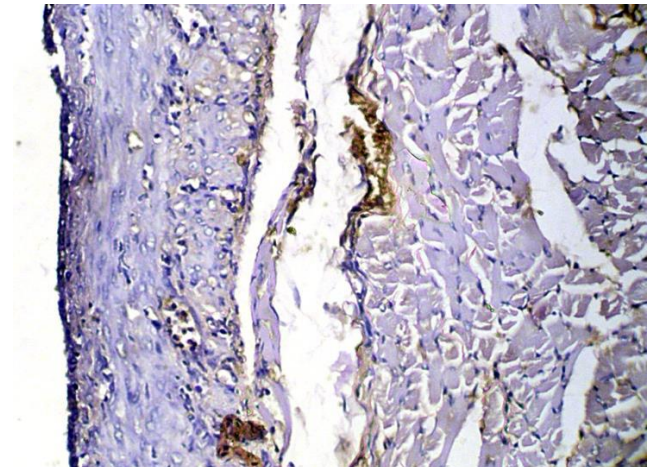


Рисунок 4.54 – MMP-2 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ та іСОХ (експериментальний ендометріоз). Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

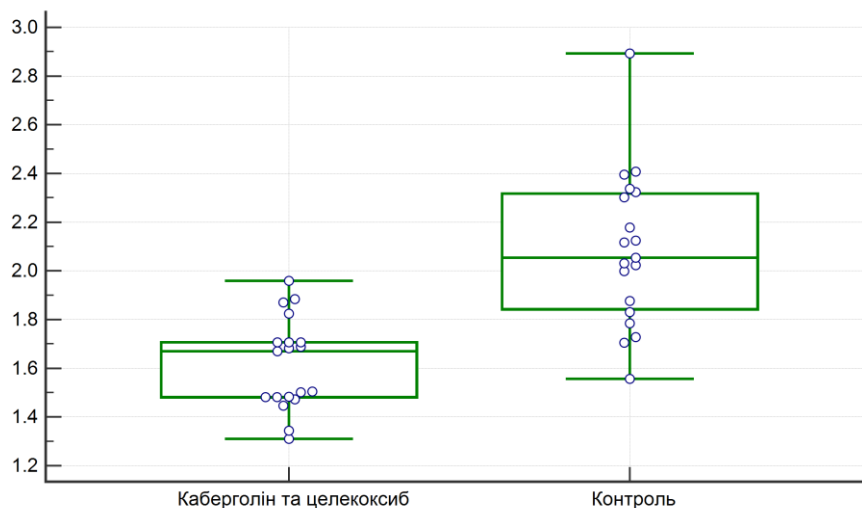


Рисунок 4.55 – Оптична щільність ІГХ MMP-2 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ та іСОХ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,001$ )

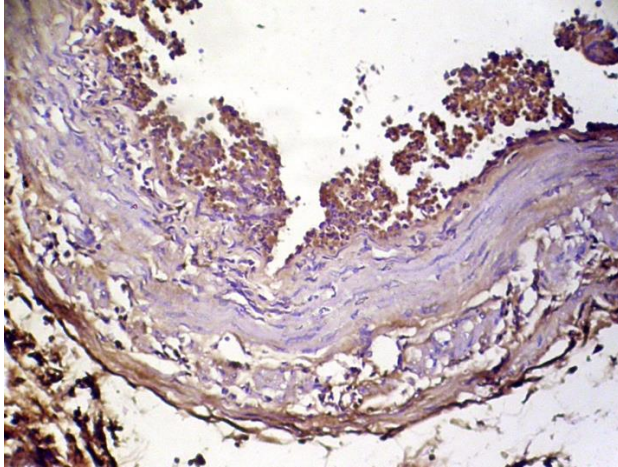


Рисунок 4.56 – MMP-9 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

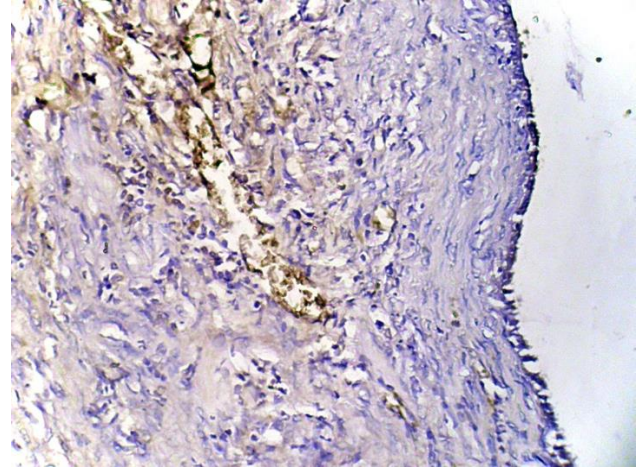


Рисунок 4.57 – MMP-9 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ та іСОХ (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

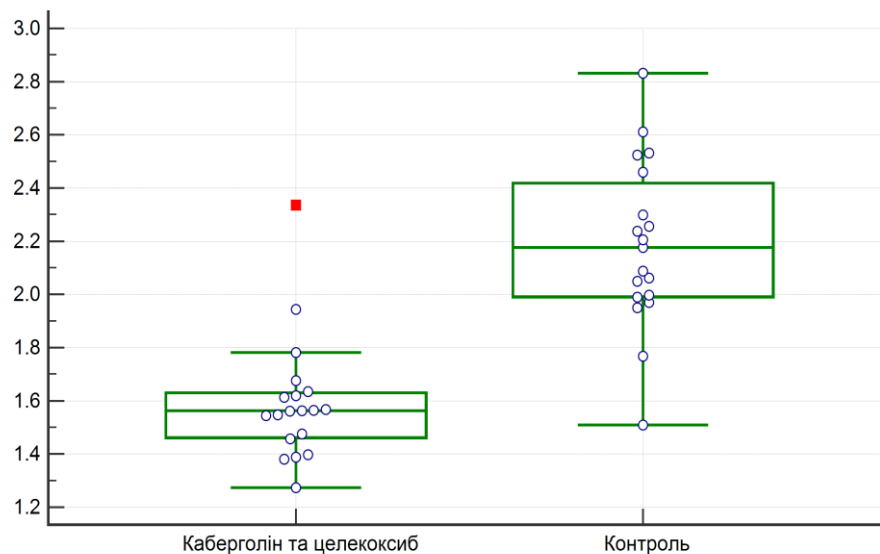


Рисунок 4.58 – Оптична щільність ІГХ MMP-9 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ та іСОХ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,001$ )

У контрольній групі при експериментальному ендометріозі нами були виявлені групи позитивно зафарбованих клітин VEGFR-2 з певною закономірністю – вони розташувалися в товщі стінок капілярів, в капілярному просторі або в міжклітинному просторі в місцях ймовірного ангіонеогенезу (судячи з кількості мігрованих клітин у вказаних ділянках) (рис. 4.59). Натомість, у дослідній групі при використанні СВГ спостерігали переважно повну відсутність позитивних VEGFR-2 клітин і лише у 3-х гістологічних зрізах виявили по 1-2 VEGFR-2 позитивній клітині (що підтверджує валідності проведеного імуногістохімічного дослідження) (рис. 4.60).

Об'єктивізацію отриманих даних імуногістохімії проводили шляхом ручного підрахунку позитивних клітин у кожному гістологічному препараті. Отримали наступні дані (рис. 4.61):  $0,15 \pm 0,37$  позитивних клітин у дослідній групі (при застосуванні СВГ) проти  $9,79 \pm 3,29$  позитивних клітин у контрольній групі ( $p < 0,0001$ ).

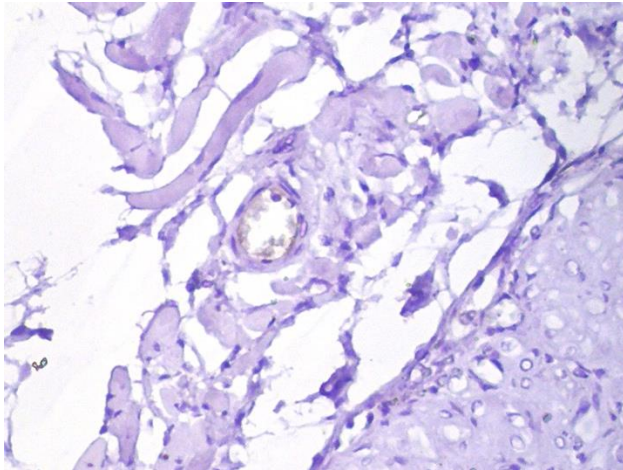


Рисунок 4.59 – VEGFR-2 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до VEGFR-2. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

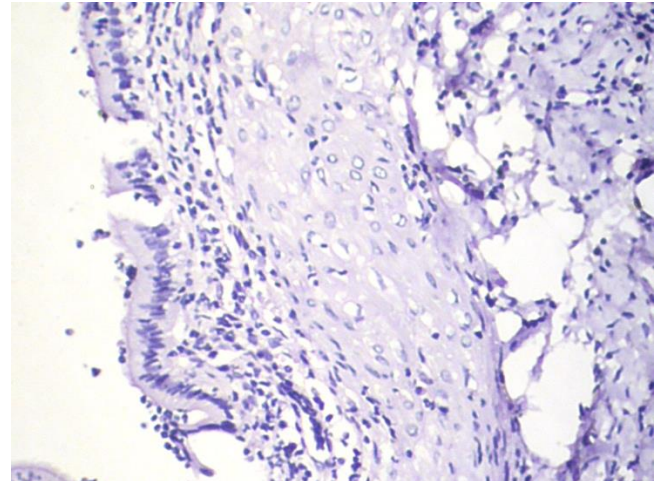


Рисунок 4.60 – VEGFR-2 в ектопічному ендометрії при застосуванні СВГ та іСОХ (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до VEGFR-2. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

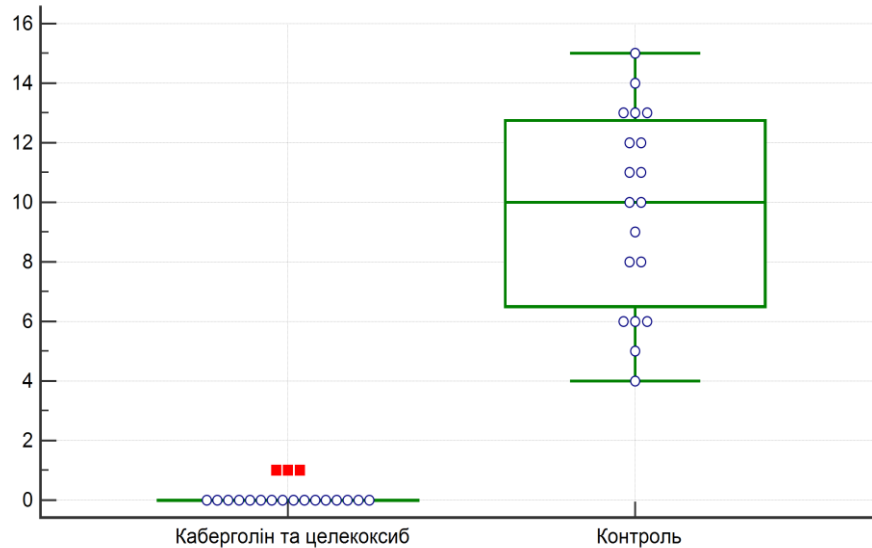


Рисунок 4.61 – Відносна кількість позитивних VEGFR-2 клітин ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні СВГ та іСОХ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,001$ )

#### **Висновки до підрозділу:**

Таким чином, застосування нами СВГ та іСОХ у комплексі при експериментальному ендометріозі у щурів, дозволило зробити наступні висновки:

1. Застосування СВГ у дозі 0,03 мг/кг маси тіла та іСОХ у дозі 30мг/кг маси тіла у щурів із індукованим експериментальним ендометріозом протягом 14 днів та через 7 днів після індукції, призвело до достовірного зменшення утворення кістоподібних утворень на місці імплантів порівняно із контролем.

2. Застосування СВГ та іСОХ у комплексі у зазначених дозах призвело до достовірного зменшення макроскопічних розмірів та об'єму уражень порівняно із контролем.

3. Застосування СВГ та іСОХ у зазначених дозах призвело до достовірного зменшення розмірів епітеліоцитів та компактизацію ядра, проте не призвело до зменшення секреторного плюсу епітеліоцитів.

4. При проведенні імуногістохімічного дослідження у дослідній групі (застосування CBG та iCOX) виявили достовірно меншу експресію MMP-2 ( $1,617 \pm 0,18$  проти  $2,08 \pm 0,31$ ,  $p = 0,0001$ ) та MMP-9 ( $1,595 \pm 0,23$  проти  $2,185 \pm 0,3145$ ,  $p = 0,0001$ ). Експресія VEGFR-2 у контрольній групі проявлялася у вигляді позитивно зафарбованих клітин з певною закономірністю, натомість у дослідній групі при використанні CBG спостерігали переважно повну відсутність позитивних VEGFR-2 клітин ( $0,15 \pm 0,37$  проти  $9,79 \pm 3,29$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.3 Експериментальний зовнішній генітальний ендометріоз при застосуванні високо-селективного інгібітора ЦОГ-2

Дана група дослідження складалася з 19-ти особин дорослих самок білих щурів, які ще не народжували, вагою 175-200 г.

Перед проведенням оперативного втручання для індукції експериментальної моделі ендометріозу, нами було проведено 2-ох разове уведення естрадіолу валерату у подвійній підтримуючій дозі ( $0,06$  мг/кг) через день, двічі – на 1-ий та 3-ій день досліду, а на 4-ий проводили оперативне втручання.

Після проведення оперативного втручання щурам вводили підтримуючу дозу естрадіолу валерату ( $0,03$  мг/кг) щодня підшкірно в ділянці спини. Це є необхідним у зв'язку з виконанням оваріектомії, що дозволило усунути можливі зміни у подальшому та різницю у гормональному фоні у різних особин.

Окрім естрогенової підтримки у даній групі тварин також застосовували високоселективний інгібітор ЦОГ-2 (iCOX) у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини щоденно.



#### 4.3.1 Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Макроскопічне дослідження ендометріюїдних вогнищ проводили одразу після евтаназії, після розкриття черевної порожнини щура П-подібним розрізом.

Враховуючи той факт, що наразі єдиним достовірним методом діагностики ендометріозу є візуальна ідентифікація вогнищ при лапароскопії з подальшою гістологічною верифікацією, є доцільною візуальна оцінка та проведення морфометрії при експериментальній моделі ендометріозу.

На основі даних морфометрії визначали об'єми уражень, що є ще одним з параметрів об'єктивізації при проведенні статичних досліджень.

Зважаючи на те, що пересаджували по два клаптя власного рогу матки кожній тварині, кількість випадків, відповідно, подвоювалася стосовно кількості тварин у даній групі.

При визначенні типів уражень отримані наступні дані (рис. 4.62): у 47,36% випадків (18 аутотрансплантованих клаптів) визначено кістозні структури з світлим або прозорим вмістом (рис. 4.64 та рис. 4.65), у 31,58% (12 аутотрансплантованих клаптів) – визначено кістозні структури з темним вмістом (рис. 4.66), у 26,3% (10 аутотрансплантованих клаптей) – не визначено кістозних структур, проте виявлено ознаки ураження очеревини (гіперемія та набряк) (рис. 4.63).

При проведенні морфометрії у групі з експериментальним ендометріозом із застосуванням високоселективного інгібітора ЦОГ-2 отримали наступні дані: середній найбільший діаметр уражень склав  $7,35 \pm 2,19$  мм, середній найменший діаметр уражень склав  $6,07 \pm 0,30$  мм.

Як можна побачити на рис 4.67 та рис 4.68 розподіл значень найбільшого на найменшого діаметрів уражень має нормальний розподіл.

При проведенні тесту Манна-Уїтні для незалежних вибірок для найменшого та найбільшого діаметру уражень отримали достовірну різницю ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контрольною групою тварин (рис. 4.69, рис. 4.70).



Рисунок 4.62 – Типи ендометріюїдних уражень, визначені при макроскопічній оцінці при застосуванні високоселективного інгібітора ЦОГ-2

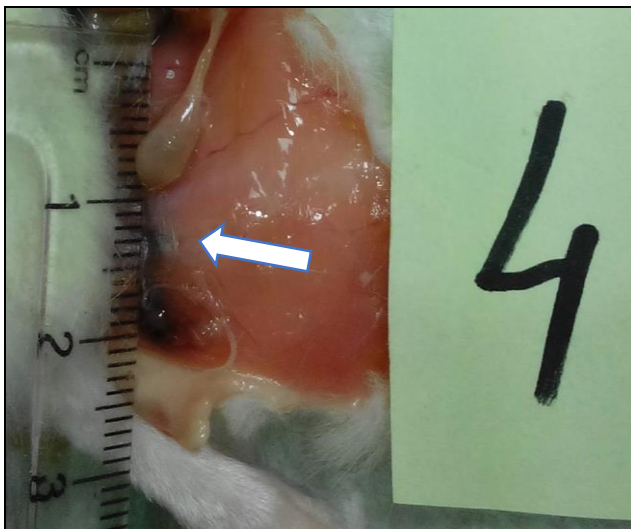


Рисунок 4.63 – На місці імплантів відсутні кістозні структури. Визначаються солідні невазуляризовані структури. Застосування іСОХ

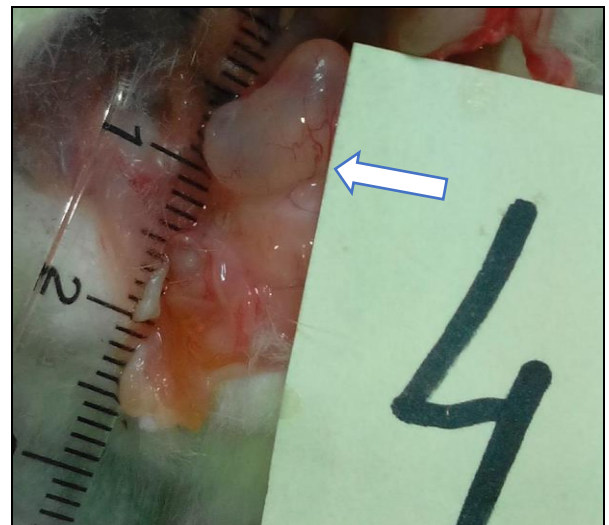


Рисунок 4.64 – На місці імплантів визначаються прозорі кісти. Застосування іСОХ.

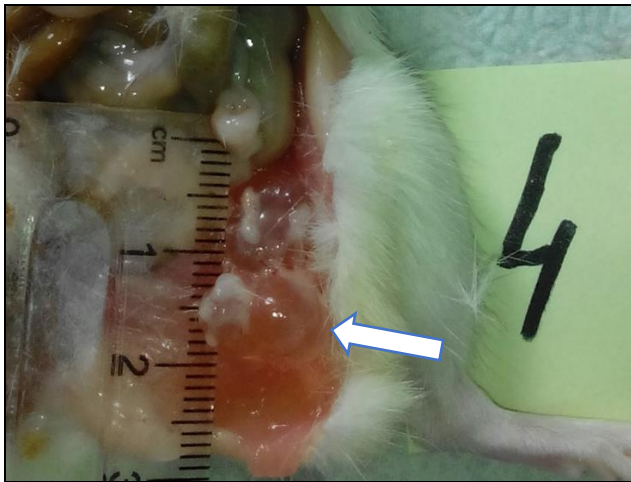


Рисунок 4.65 – На місці імплантів визначаються дрібні, прозорі кісти. Застосування іСОХ

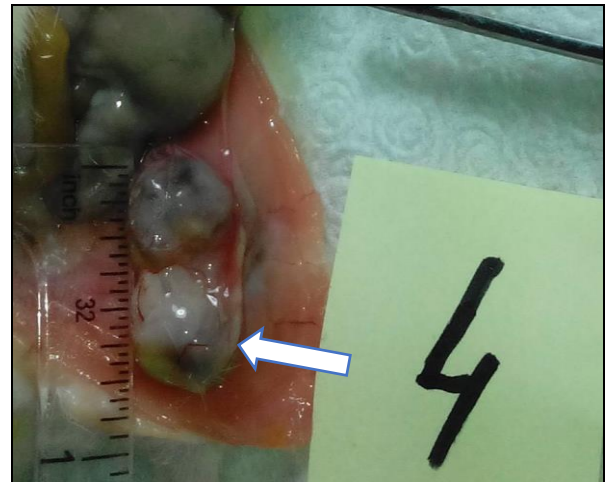


Рисунок 4.66 – На місці імплантів визначаються кісти заповнені темною рідиною. Застосування іСОХ

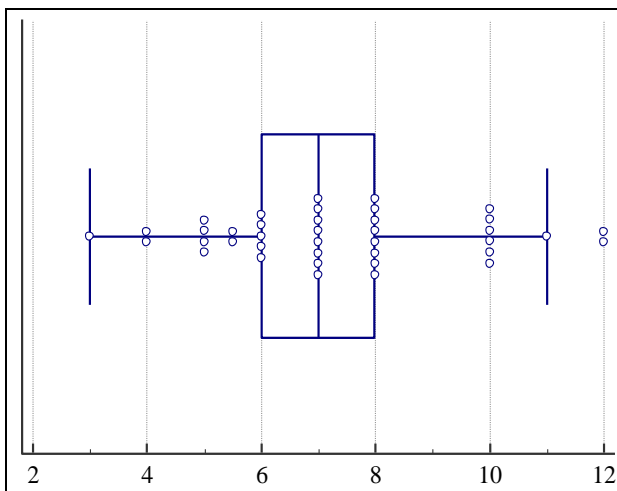


Рисунок 4.67 – Розподіл значень найбільшого діаметру уражень при застосуванні іСОХ, мм

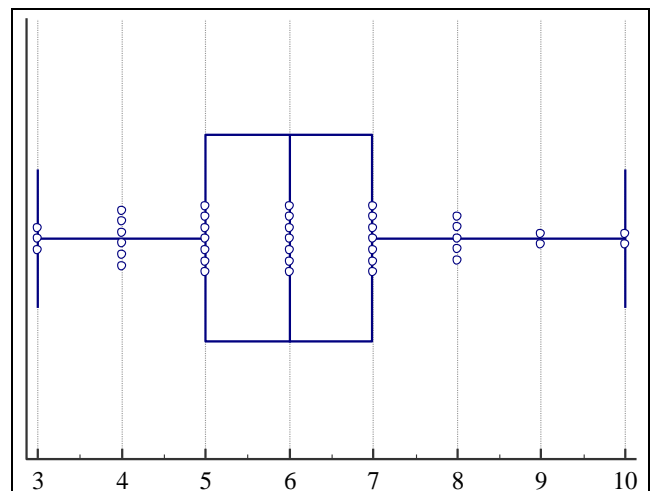


Рисунок 4.68 – Розподіл значень найменшого діаметру уражень застосуванні іСОХ, мм

Середній об'єм ендометріюїдних кістоподібних утворень, розрахований за модифікованою формулою напівсфери склав  $99,45 \pm 13,20 \text{ мм}^3$ . На рис. 4.71 показаний розподіл значень об'єму кістоподібних утворень. Довірчий інтервал знаходиться в межах  $72,73 \text{ мм}^3 - 126,18 \text{ мм}^3$ . 12 випадків ектопій (31,57%) мали

III ступінь росту, 10 випадків (26,3%) – I ступінь росту за Quereda, решта випадків – II ступінь.

Об'єм кістоподібних утворень при лікуванні іСОХ був достовірно меншим ( $p < 0,0001$ ) порівняно із контролем (99,45 мм<sup>3</sup> проти 243,88 мм<sup>3</sup>) (рис. 4.72).

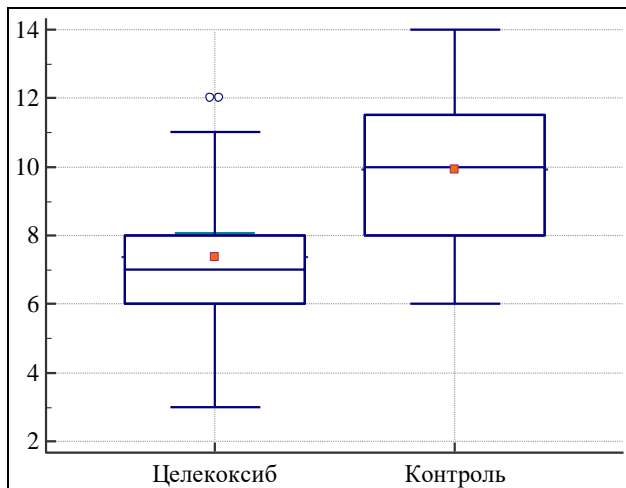


Рисунок 4.69 – Найбільший діаметр уражень порівняно із контролем, мм.  
Застосування іСОХ.  $p < 0,0001$

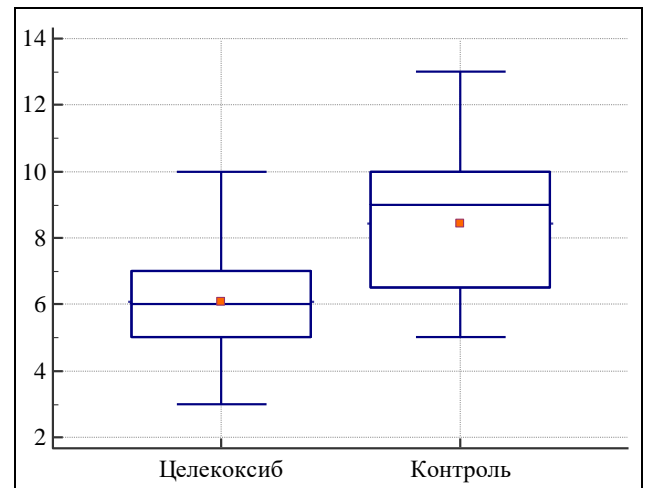


Рисунок 4.70 – Найменший діаметр уражень порівняно із контролем, мм.  
Застосування іСОХ.  $p < 0,0001$

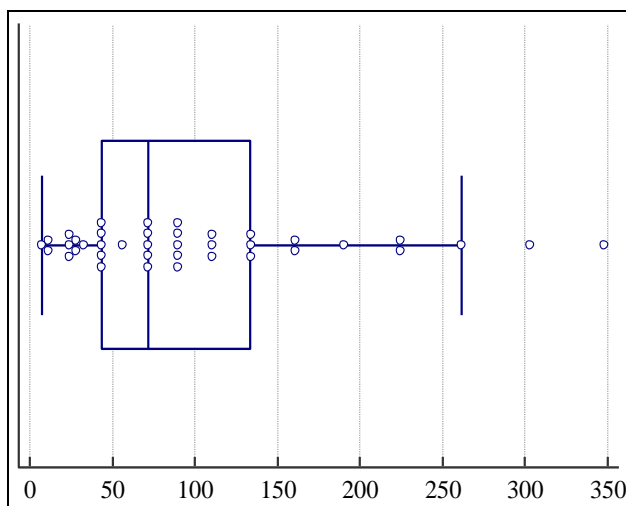


Рисунок 4.71 – Розподіл значень об'єму кістоподібних утворень у групі із застосуванням іСОХ, мм<sup>3</sup>

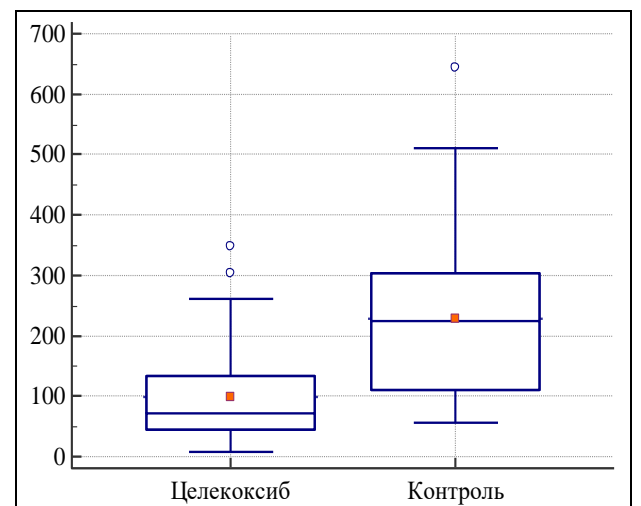


Рисунок 4.72 – Об'єм кістоподібних утворень порівняно із контролем, мм<sup>3</sup>.  
Застосування іСОХ.  $p < 0,0001$

#### 4.3.2 Гістологічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Забір матеріалу для гістологічного дослідження проводили одразу після макроскопічного дослідження згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.

Проведено дослідження гістологічних препаратів тканини індукованого ураження. Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному мікротомі робили гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксиліном і еозином.

При мікроскопічному дослідженні ендометріюїдних уражень у групі тварин, у яких застосували іСОХ спостерігали залозистий секретуючий епітелій з ознаками вакуолізації, орієнтований секретуючим полюсом в бік порожнини кісти; нижче розташувалася цитогенна строма та міометральна основа (рис. 4.73, рис. 4.74).

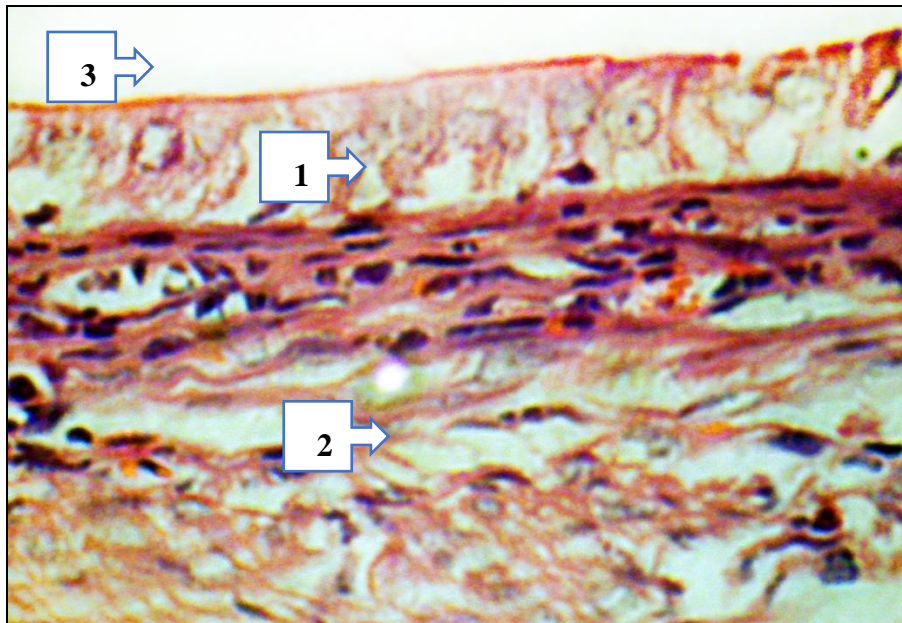


Рисунок 4.73 – Експериментальний ендометріоз. Застосування іСОХ (14 днів). 26-ий день досліду. 1 – залозистий епітелій, 2 – цитогенна строма, 3 – порожнина кісти. Гематоксилін і еозин. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

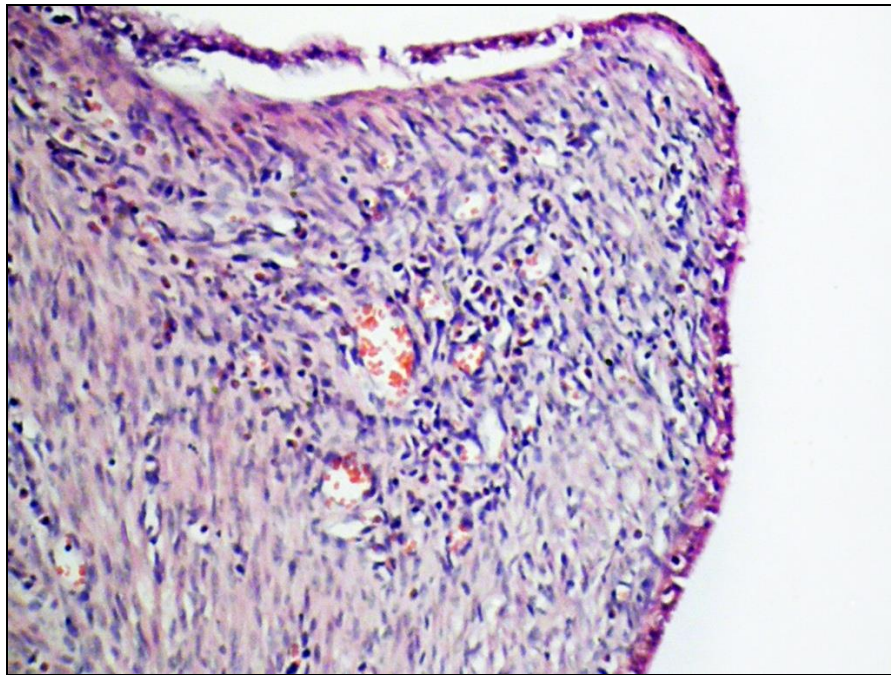


Рисунок 4.74 – Експериментальний ендометріоз. Застосування іСОХ (14 днів).  
26-ий день дослідю.

Гематоксилін і еозин. Об.  $10^x$ , Ок.  $10^x$

Визначали наступні морфометричні параметри: висота клітин залозистого епітелію, висота секреторної частини клітин залозистого епітелію, визначення площі ядра, проведення денситометрії ядра та клітини в цілому.

Дані морфометрії та їх статистична обробка наведені у таблиці 4.3.

При проведенні порівняльного аналізу морфометричних показників у даної групи порівняно із контрольною групою тварин, визначено, що висота епітеліоцитів (46,14 мкм проти 50,01 мкм,  $p > 0,05$ ) та висота секреторного полюсу епітеліоцитів (18,62 мкм проти 16,3 мкм,  $p > 0,05$ ) (рис. 4.75 та рис 4.76) достовірно не відрізнялися (рис. 4.79 та рис. 4.80), площа ядра ( $13,45 \text{ мкм}^2$  проти  $76,27 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,0001$ ) (рис. 4.77 та рис. 4.81) була достовірно меншою ( $p < 0,0001$ ) ніж у контрольній групі. Натомість, відносна щільність ядра у групі дослідю була вищою (95,10 проти 84,92) (рис. 4.78 та рис. 4.82) чим в контролі ( $p < 0,05$ ), а відносна щільність клітин відрізнялася (114,1 проти 109,95) недостовірно ( $p > 0,05$ ).

На нашу думку, збільшення щільності ядра у групі досліді при одночасному зменшенні його розмірів свідчить про пригнічення процесів трансляції та синтезу білків. Проте відсутність достовірною різниці висоти клітин та їх секреторного полюсу може свідчити про запізніле пригнічення їх діяльності або ж про неповне пригнічення функціональної активності.

Таблиця 4.3 – Основні морфометричні характеристики залозистого епітелію експериментальних ендометріюїдних гетеротопій у групі тварин, яким застосували іСОХ

| Гістологічний параметр                  | Середня | 95% Ді середньої  | Медіана | 95% Ді медіани    | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | Кількість вимірів |
|-----------------------------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Висота клітини, мкм                     | 46,14   | 43,21 –<br>49,06  | 47,02   | 41,37-<br>51,85   | 7,09                  | 1,41               | 50                |
| Висота секреторного полюсу клітини, мкм | 18,62   | 16,26-<br>20,97   | 19,55   | 16,81-<br>22,47   | 5,70                  | 1,14               | 50                |
| Площа ядра, мкм <sup>2</sup>            | 13,45   | 12,77-<br>14,14   | 13,90   | 12,24-<br>14,63   | 1,42                  | 0,32               | 48                |
| Відносна щільність ядра, 0-255          | 95,10   | 94,26-<br>95,93   | 95,00   | 94,00-<br>96,00   | 1,77                  | 0,39               | 40                |
| Відносна щільність клітини, 0-255       | 114,1   | 111,63-<br>116,56 | 114,50  | 112,00-<br>117,66 | 5,27                  | 1,17               | 40                |

Вважаємо, що дані зміни можливо пов'язати із дією високоселективного інгібітора ЦОГ-2 іСОХ, який ймовірно пригнічував ангиогенез через

опосередковані механізми пригнічення VEGF та ЦОГ-2 шляхи ангіогенезу [255].

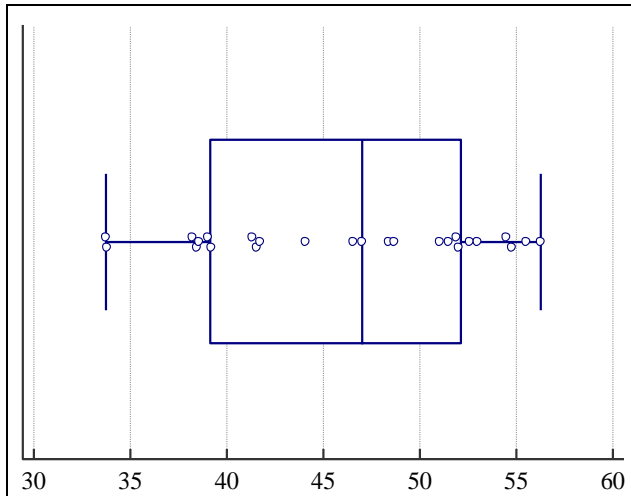


Рисунок 4.75 – Застосування іСОХ.

Розподіл значень висоти епітелію, мкм

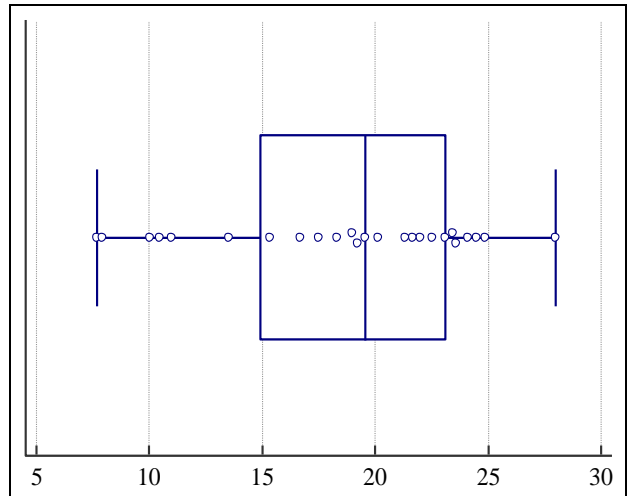


Рисунок 4.76 – Застосування іСОХ.

Розподіл значень висоти секреторного

плюсу клітини, мкм

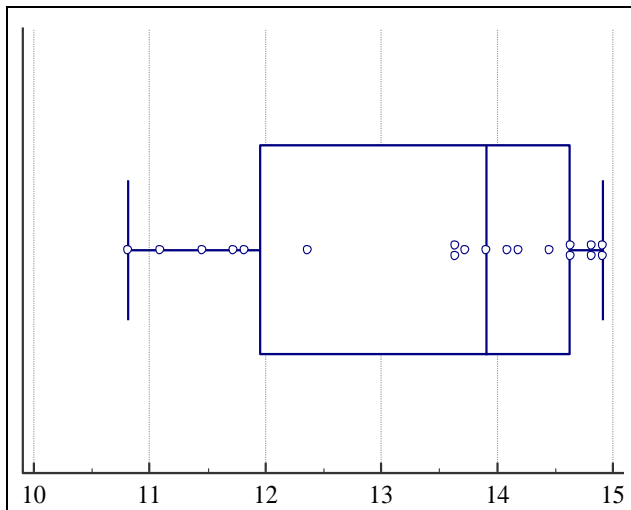


Рисунок 4.77 – Застосування іСОХ.

Розподіл значень площі ядра  
епітеліоцитів, мкм<sup>2</sup>

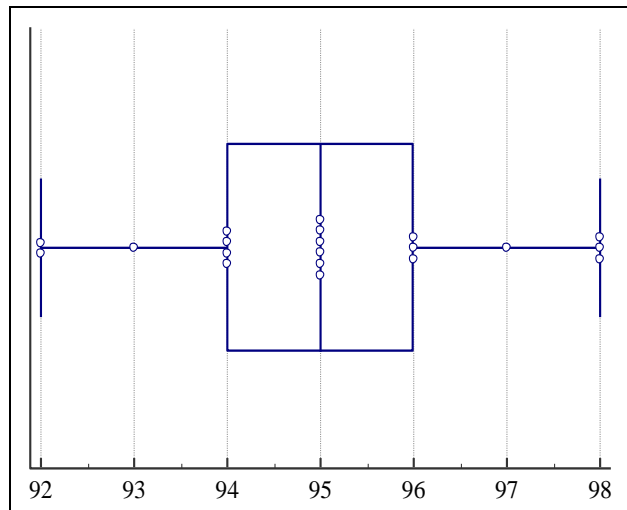


Рисунок 4.78 – Застосування іСОХ.

Розподіл значень відносної щільності  
ядра, 0-255



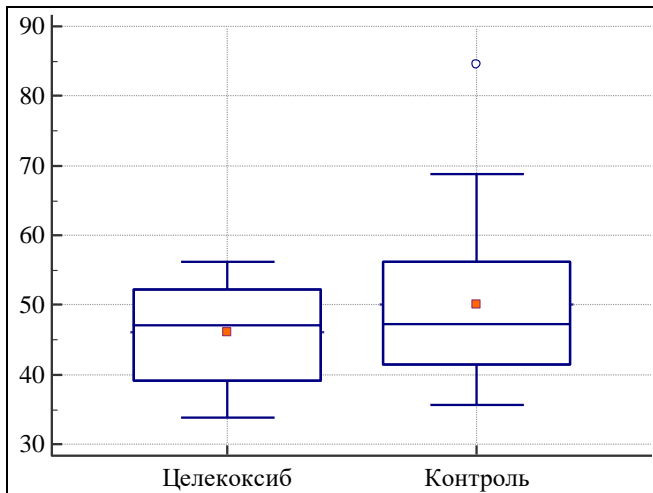


Рисунок 4.79 – Застосування іСОХ.  
Висота епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p > 0,05$

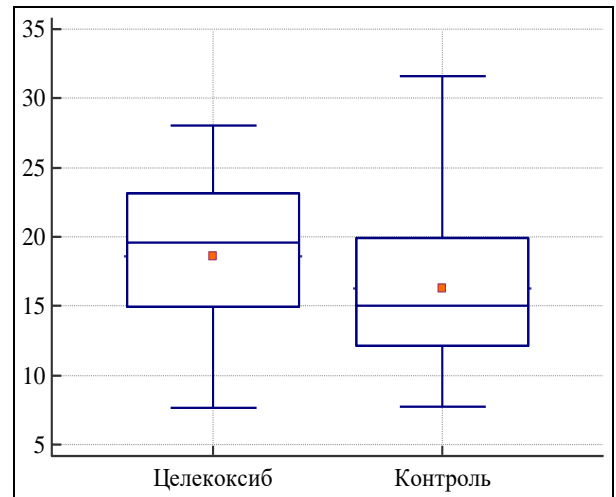


Рисунок 4.80 – Застосування іСОХ.  
Висота секреторного полюсу епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм.  $p > 0,05$

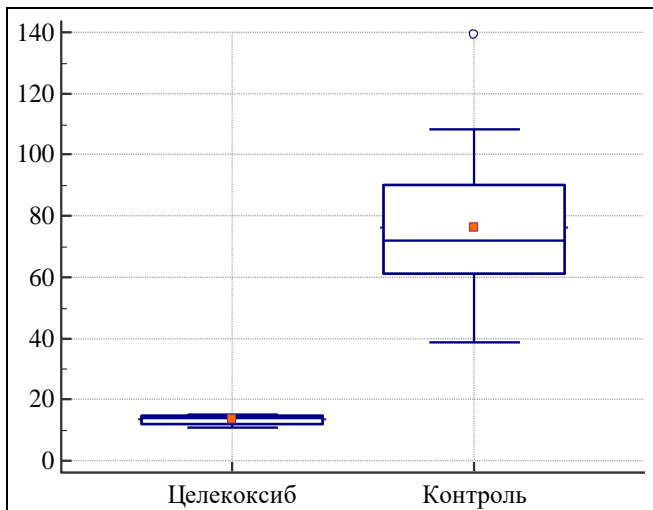


Рисунок 4.81 – Застосування іСОХ.  
Площа ядра епітеліоцитів порівняно із контролем, мкм<sup>2</sup>.  $P < 0,0001$

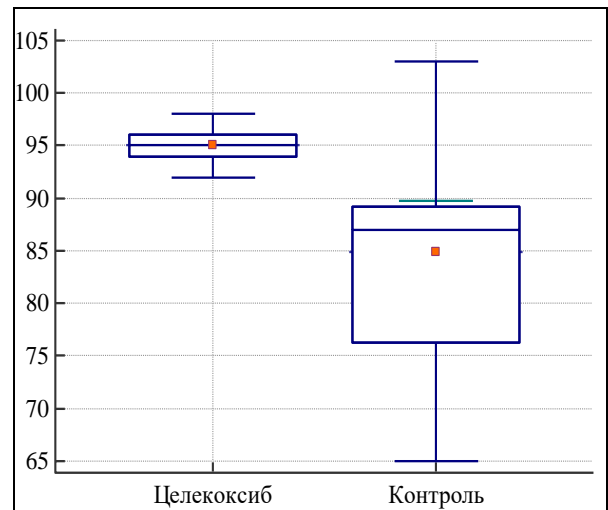


Рисунок 4.82 – Застосування іСОХ.  
Відносна густина ядра епітеліоцитів порівняно із контролем, 0-255.  $P < 0,05$

### 4.3.3 Імуногістохімічне дослідження ендометріюїдних вогнищ

Після проведення оглядової мікроскопії були відібрані репрезентативні гістологічні мікропрепарати для кожного суб'єкту дослідження для подальшого імуногістохімічного дослідження. Імуногістохімічне дослідження з визначення

концентрації MMP-2, MMP-9 та рецепторів VEGFR-2 проводилося з використанням первинних антитіл до MMP-2, MMP-9, VEGFR-2 та системи детекції HRP/DAB (HRP/DAB Detection ІНС kit) з використанням діамінобензенового барвника (виробництво Abscam, Кембрідж, Об'єднане Королівство). Ядра клітин були додатково зафарбовані за допомогою розчину гематоксиліну Майєра або Грота.

При визначенні MMP-2 у ектопічному ендометрії у контрольній групі з експериментальним ендометріозом встановили, що найбільша інтенсивність спостерігалася у епітелію, у субепітеліальній ділянці та у стромі й навколо судин. Інтенсивність забарвлення зростала згідно градієнту вглиб стромі (рис. 4.83).

Визначення MMP-2 в ектопічному ендометрії в групі із застосуванням іСОХ не виявило суттєвого візуального зниження експресії. Персистенцію експресії MMP-2 виявили як в епітеліальному шарі, так і в стромі (рис. 4.84).

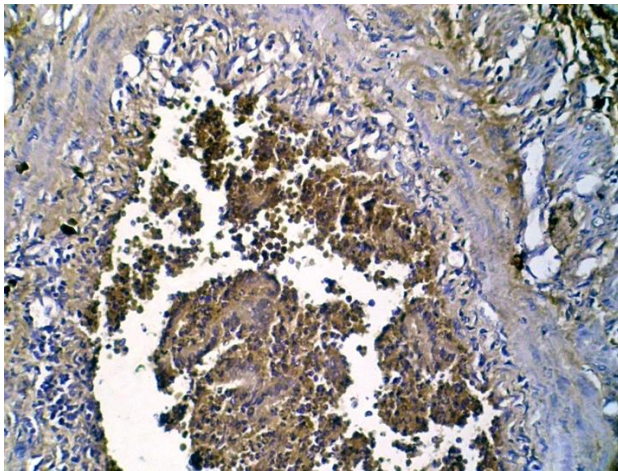


Рисунок 4.83 – MMP-2 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз).

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

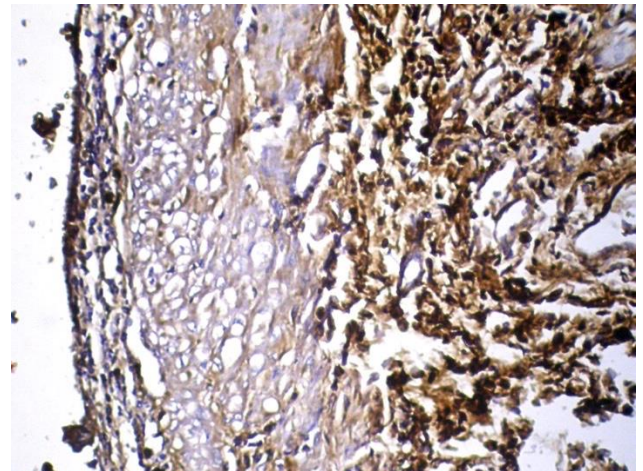


Рисунок 4.84 – MMP-2 в ектопічному ендометрії при застосуванні іСОХ (експериментальний ендометріоз).

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

При проведенні об'єктивізації даних імуногістохімічного дослідження за допомогою програмного забезпечення ImageJ в комплексі з ІНС Profiler у дослідній групі визначили недостовірно вищі значення оптичної густини ІГХ –  $2,29 \pm 0,18$  проти  $2,08 \pm 0,31$  ( $p = 0,06$ ) (рис. 4.85).

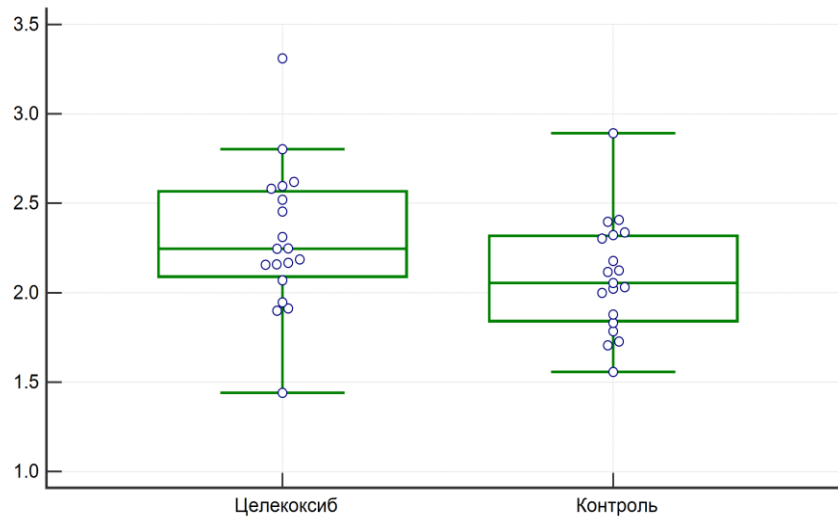


Рисунок 4.85 – Оптична щільність ІГХ MMP-2 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні іСОХ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,0638$ )

Експресія MMP-9 у ектопічному ендометрії контрольної групи мала наступну закономірність: виражена активність у епітеліальних клітинах, у субепітеліальному шарі, нижче, зазвичай, розташувалася смуга строми з мінімальною активністю, а далі іСОХ виражено позитивна цитогенна строма (рис 4,86). У дослідній групі при застосуванні іСОХ (рис. 4.87) активність MMP-9 у епітеліальному все ще зберігалася, а у стромі спостерігали певне групування інтенсивних ділянок навколо судин. Оптична щільність ІГХ складала  $2,487 \pm 0,26$  проти  $2,185 \pm 0,3145$  (при  $p = 0,03$ ) (рис. 4.88), що вказує на недостовірну підвищену експресію MMP-9 при застосуванні іСОХ.

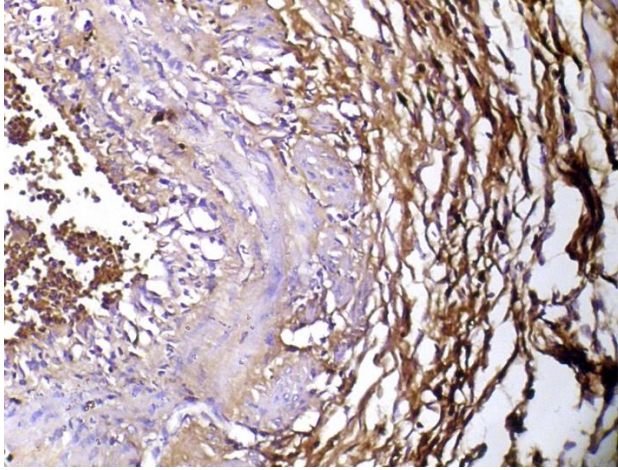


Рисунок 4.86 – MMP-9 в ектопічному ендометрії у контрольній групі (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

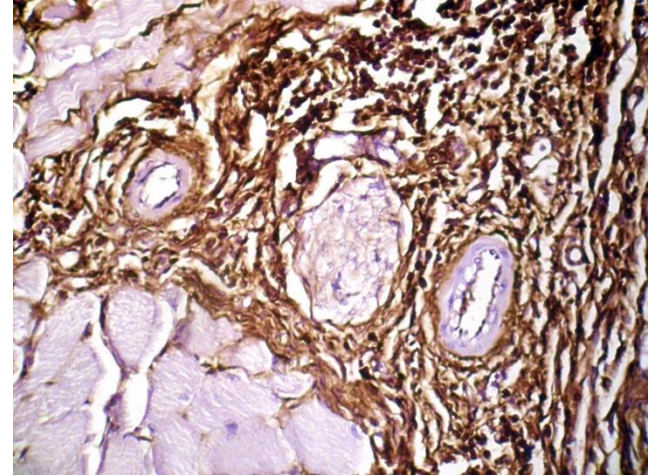


Рисунок 4.87 – MMP-9 в ектопічному ендометрії при застосуванні іСОХ (експериментальний ендометріоз).  
Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $40^x$ , Ок.  $10^x$

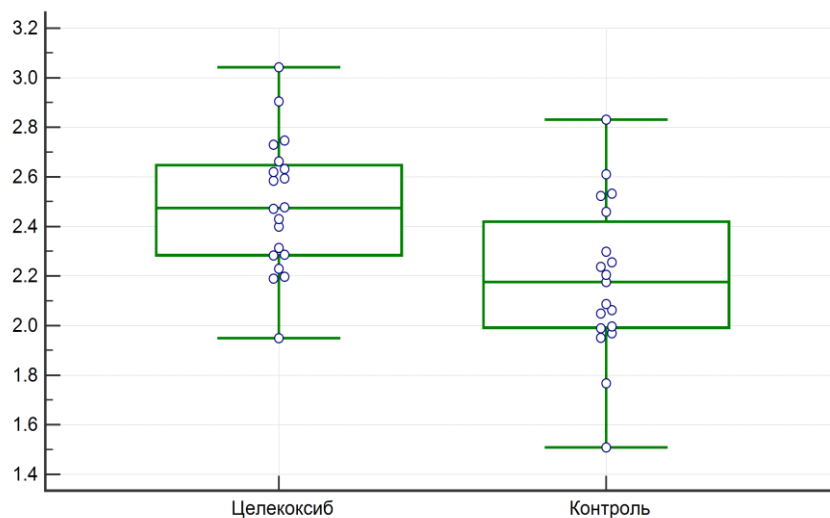


Рисунок 4.88 – Оптична щільність ІГХ MMP-9 ектопічного ендометрія у дослідній (при застосуванні іСОХ) та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,05$ )

У контрольній групі при експериментальному ендометріозі нами були виявлені групи позитивно зафарбованих клітин VEGFR-2 розташовані в товщі

стінок капілярів, в капілярному просторі або в міжклітинному просторі в місцях ймовірного ангіонеогенезу (рис. 4.89). У дослідній групі при використанні іСОХ спостерігали мінімальну кількість позитивних VEGFR-2 клітин (у 25% суб'єктів по 1-3 позитивні клітини) (рис. 4.90).

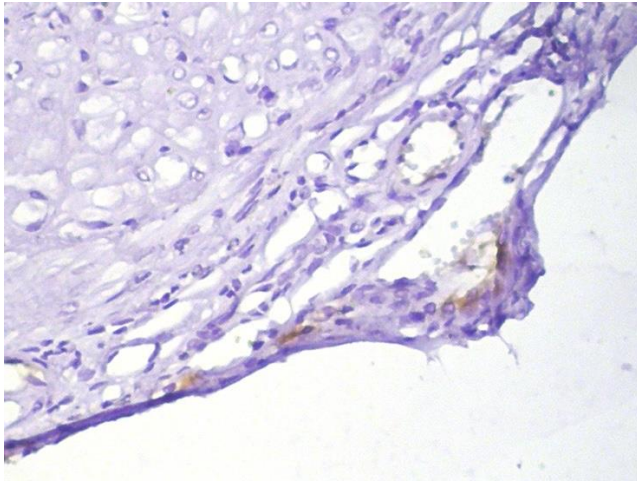


Рисунок 4.89 – VEGFR-2 в  
ектопічному ендометрії у  
контрольній групі

(експериментальний ендометріоз).

Імуногістохімія, первинні антитіла до  
VEGFR-2. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

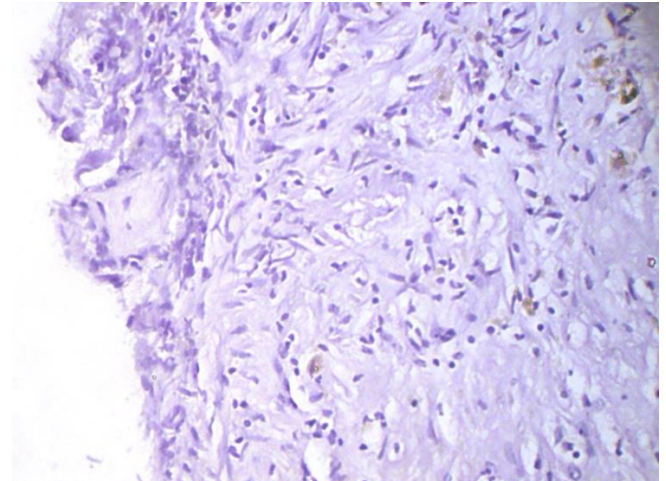


Рисунок 4.90 – VEGFR-2 в  
ектопічному ендометрії при  
застосуванні іСОХ

(експериментальний ендометріоз).

Імуногістохімія, первинні антитіла до  
VEGFR-2. Об.10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

Об'єктивізацію отриманих даних імуногістохімії проводили шляхом ручного підрахунку позитивних клітин у кожному гістологічному препараті. Отримали наступні дані (рис. 4.91):  $0,26 \pm 0,45$  позитивних клітин у дослідній групі (при застосуванні іСОХ) проти  $9,79 \pm 3,29$  позитивних клітин у контрольній групі ( $p < 0,0001$ ) [259].

#### **Висновки до підрозділу:**

Таким чином, застосування нами іСОХ при експериментальному ендометріозі у щурів, дозволило зробити наступні висновки:



VEGFR-2 у контрольній групі проявлялася у вигляді позитивно зафарбованих клітин з певною закономірністю, у дослідній групі при використанні iCOX спостерігали достовірно меншу кількість позитивних VEGFR-2 клітин ( $0,26 \pm 0,45$  проти  $9,79 \pm 3,29$ ,  $p < 0,0001$ ).

Результати розділу опубліковані в наукових працях автора: [242, 243, 250, 255, 257]

## РОЗДІЛ 5

## МОРФОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНДОМЕТРІЯ У ЖІНОК ОСНОВНОЇ ТА ДОСЛІДНОЇ ГРУП

5.1 Клінічні особливості соматичного та репродуктивного анамнезу у жінок досліджуваних груп

Для вирішення поставленої задачі нами було проведено ретельне клінічне порівняння жінок із підозрою на ендометріоз (31 пацієнтка) та контрольною групою жінок без клінічних та об'єктивних ознак ендометріозу (12 осіб).

Віковий склад обстежуваних жінок знаходився в межах від 22 до 40 років.

Детальна анамнестична характеристика досліджуваних пацієнток наведена в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Анамнестична характеристика досліджуваних пацієнток дослідної та контрольної груп

| Показник                                                             | Дослідна група,<br>n=31 | Контрольна<br>група, n=12 | p     |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| Вік, років                                                           | 32,61± 7.26             | 37,00 ± 6,16              | 0,07  |
| Кількість вагітностей                                                | 0,87 ± 0,54             | 1,66 ± 0,98               | 0,022 |
| Кількість пологів                                                    | 0,77 ± 0,80             | 1,25 ± 0,96               | 0,139 |
| Кількість перерваних<br>вагітностей                                  | 0                       | 0                         | -     |
| Кількість мимовільних<br>викиднів                                    | 0,06 ± 0,24             | 0,16 ± 0,38               | 0,35  |
| Примітка. Значення виражені як середні ± SD (стандартне відхилення). |                         |                           |       |

Віковий розподіл пацієнтів дослідної групи (з наявним ендометріозом) вказаний на рис. 5.1; контрольної – на рис. 5.2.



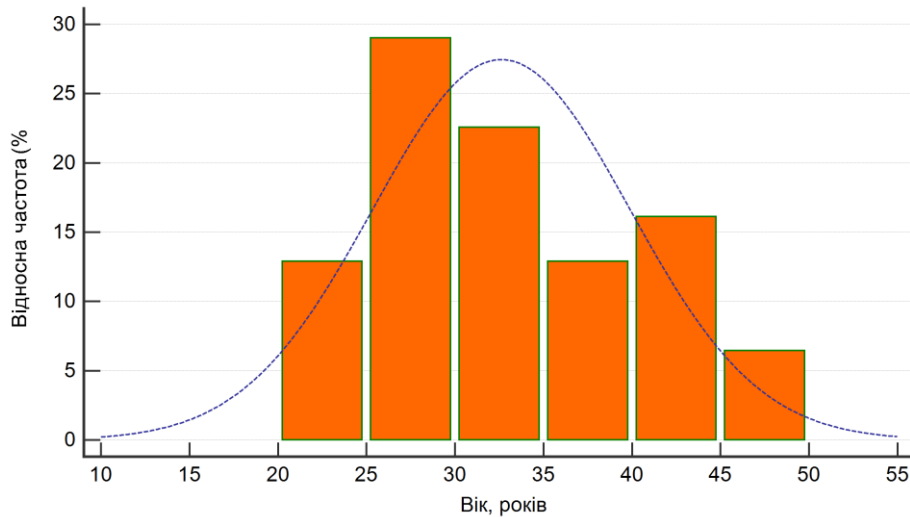


Рисунок 5.1 – Віковий розподіл пацієнтів дослідної групи

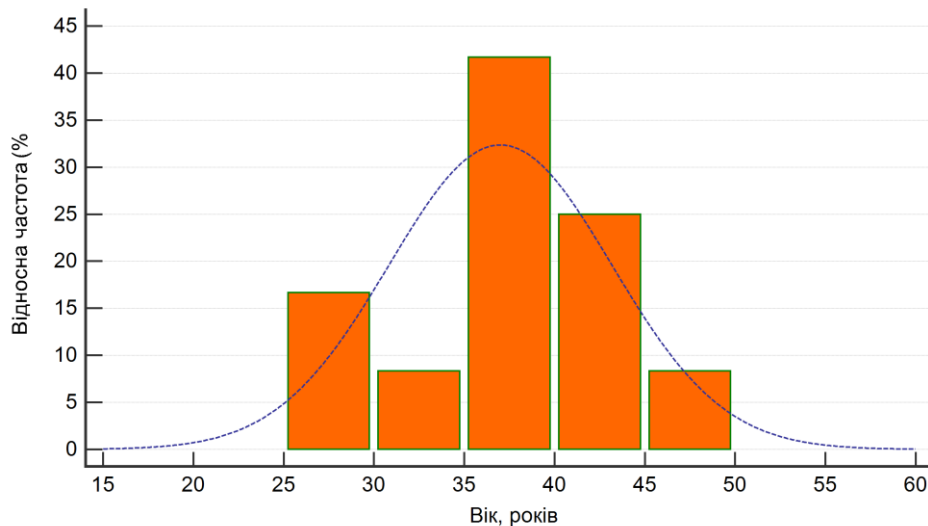


Рисунок 5.2 – Віковий розподіл пацієнтів контрольної групи

Загально-клінічні показники периферійної крові дослідної та контрольної груп вказані в таблиці 5.2.

Як видно з таблиці 5.2, як в дослідній, так і в контрольній групі не спостерігаються жодні особливості.

Основні біохімічні показники периферійної крові та коагулограма вказані в таблиці 5.3.

Дані онкомаркерів СА-125, HE4 а також індексу ROMA представлені в таблиці 5.4.

Таблиця 5.2 – Загально-клінічні показники дослідної та контрольної груп

| Показник                        | Дослідна група | Контрольна група | p    |
|---------------------------------|----------------|------------------|------|
| ШОЕ, мм/с                       | 5,58 ± 2,04    | 6,08 ± 1,24      | 0,45 |
| Гематокрит, %                   | 39,18±2,73     | 40,65 ± 2,28     | 0,06 |
| Гемоглобін, г/л                 | 131,32 ± 8,53  | 122,75 ± 14,45   | 0,06 |
| Еритроцитів, Г/л                | 4,53 ± 0,28    | 4,64 ± 0,30      | 0,20 |
| Тромбоцити, Г/л                 | 221,32 ± 29,50 | 231,50 ± 18,80   | 0,09 |
| Лейкоцити, Г/л                  | 5,30 ± 1,46    | 5,43 ± 0,96      | 0,48 |
| Лімфоцити, %                    | 33,77 ± 4,36   | 36,83 ± 5,16     | 0,08 |
| Моноцити, %                     | 4,19 ± 1,13    | 4,08 ± 1,44      | 0,77 |
| Нейтрофіли, %                   | 3,96 ± 0,70    | 4,08 ± 0,66      | 0,68 |
| Нейтрофіли<br>сегментоядерні, % | 56,09 ± 5,15   | 53,25 ± 5,37     | 0,08 |
| Еозинофіли, %                   | 1,96 ± 2,70    | 1,75 ± 0,86      | 0,42 |
| Базофіли, %                     | 0              | 0                | 0,97 |

Таблиця 5.3 – Основні біохімічні показники крові та коагулограма

| Показник                      | Дослідна група | Контрольна група | p    |
|-------------------------------|----------------|------------------|------|
| Загальний білок, г/л          | 71,27 ± 6,1    | 69,69 ± 4,13     | 0,21 |
| Загальний білірубін, мкмоль/л | 10,64 ± 5,4    | 8,77 ± 1,95      | 0,21 |
| Креатинін, мкмоль/л           | 69,15 ± 14,91  | 82,00 ± 9,76     | 0,06 |
| Сечовина, ммоль/л             | 4,17 ± 1,12    | 3,88 ± 0,94      | 0,62 |
| Протромбіновий час, сек       | 11,06 ± 0,65   | 11,34 ± 0,92     | 0,21 |
| Протромбіновий індекс, %      | 108,16 ± 5,82  | 108,54 ± 6,00    | 0,93 |
| Тромбіновий час, сек          | 16,09 ± 1,04   | 16,94 ± 0,72     | 0,07 |
| Фібриноген, г/л               | 2,50 ± 0,48    | 2,48 ± 0,42      | 0,71 |

Як видно з таблиці 5.4 та з рис. 5.3, у дослідній групі спостерігалось достовірне підвищення показників СА-125 – при нормальних референсних значеннях у 35,0 Од/мл, у дослідній групі ми отримали 59,55 Од/мл з доволі значним стандартним відхиленням; також це стосується НЕ4 – при референсних значеннях у 60,5 пмоль/л (для віку до 40 років), у дослідній групі ми отримали 24,36 пмоль/л. На рис. 5.3 та 5.4. зображено гістограми розподілу значень обох онкомаркерів для дослідної групи. Нормальний розподіл наявний тільки для СА-125 та має вигляд оберненої параболи з піком на 57,45 пмоль/л.

Таблиця 5.4 – Рівні онкомаркерів у досліджуваних групах

| Показник      | Дослідна група | Контрольна група | p      |
|---------------|----------------|------------------|--------|
| СА-125, Од/мл | 59,55 ± 29,14  | 11,78 ± 2,25     | 0,0003 |
| НЕ4, пмоль/л  | 51,21 ± 13,45  | 24,36 ± 3,15     | 0,0003 |
| Індекс ROMA   | 9,10 ± 4,45    | 1,43 ± 0,42      | 0,004  |

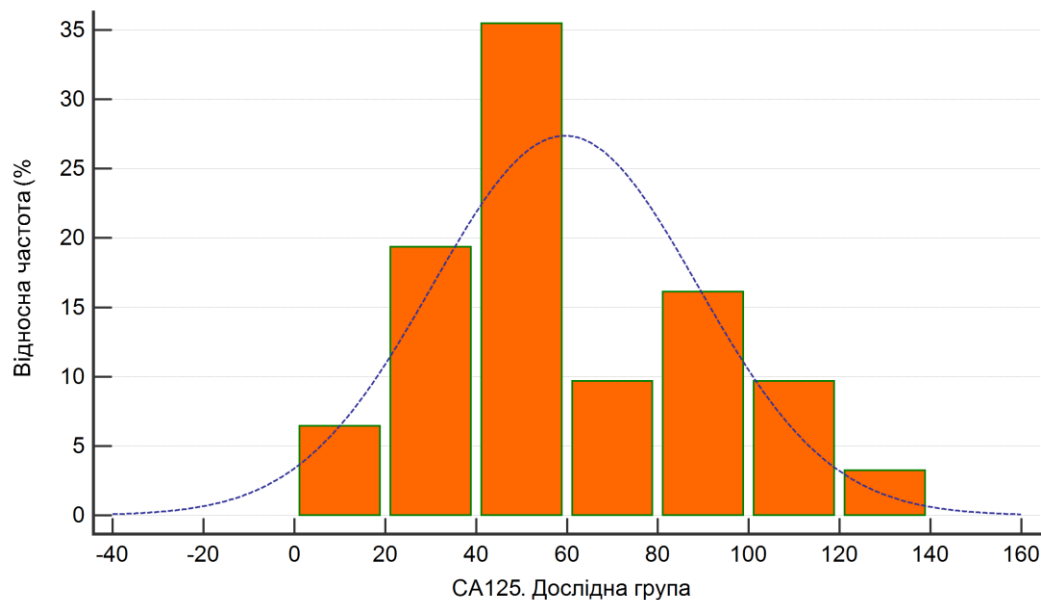


Рисунок 5.3 – Розподіл значень онкомаркеру СА-125 у дослідній групі

Отримані нами дані чітко корелюють з даними Oliveira et al. (2017) та Fiala et al. (2018) [260, 261]. Автори дійшли до висновку, що СА-125 може бути

корисним для діагностики глибокого ендометріозу, особливо коли периферична кров для аналізу зібрана під час менструації або в першій половині менструального циклу. Що стосується HE4, отримані нами дані не були настільки ж інформативними, як і СА-125, і це корелює з даними Mckinnon et al. (2015) [262].

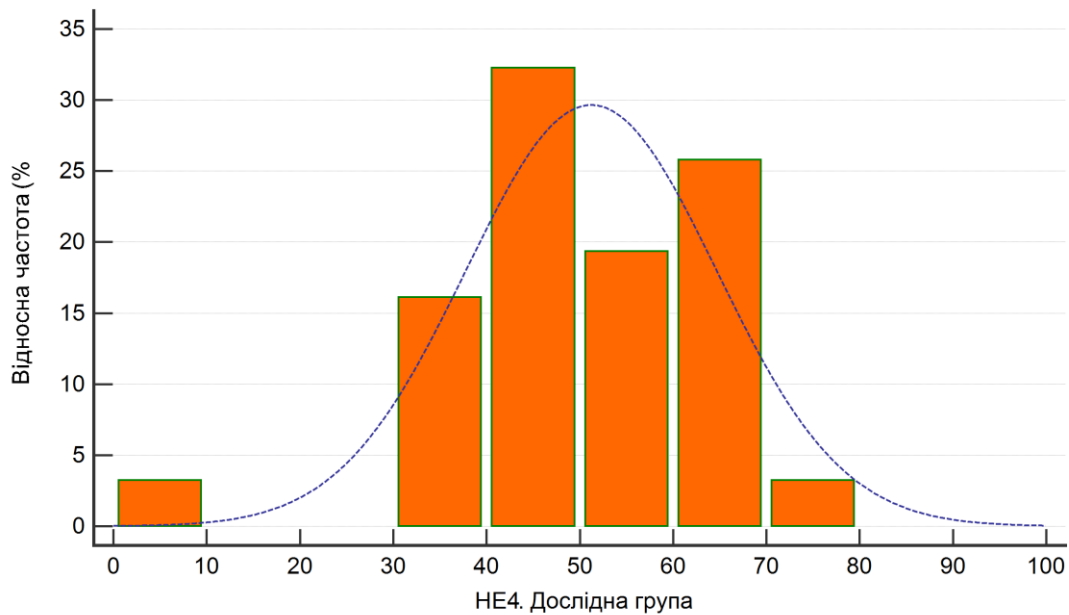


Рисунок 5.4 – Розподіл значень онкомаркери HE4 у дослідній групі

## 5.2 Роль желатиназ (матриксних металопротеїназ) та ангіонеогенетичних факторів у клініці раннього ендометріозу

Матриксні металопротеїнази – це сімейство цинкозалежних ендопептидаз, які беруть участь у деградації позаклітинного матриксу [263-265].

Вони мають важливе значення як у фізіологічних, так і таких патологічних процесах, як інфільтрація та поширення злоякісних пухлин. Крім того, вони присутні в еутопічному та ектопічному ендометрії.

ММР-2 (желатиназа А) – це колагеназа IV типу, яка особливо важлива для деградації базальної мембрани. Надмірна її експресія виявлена у багатьох

злюкисних пухлин, а також в ендометрії пацієнтів, які страждають на ендометріоз [266].

ММР-9 (желатиназа В) також розщеплює колаген типу IV і додатково розщеплює колаген II та V типу, желатин, галектин-3 та еластин. Продемонстровано його наявність при багатьох видах раку, включаючи злюкисні клітини та навколишню строму. ММР-9 можна виявити при інфільтративному ендометріозі. Як і желатиназа А, желатиназа В присутня не тільки в нормальному ендометрії в проліферативній фазі, але і в гіперпластичному ендометрії та при раку ендометрія.

Вважається, що ММР може наділити ендометріальну тканину можливістю розщепляти перитонеальний позаклітинний матрикс та нижчерозташовану базальну сполучну тканину. Також добре відомо, що ремоделювання ендометрія та експресія ММР відбуваються під час проліферативної та менструальної фаз циклу [267], і що прогестерон є сильним пригнічувачем ММР.

Виробництво ММР та їх інгібіторів відбувається в стромі та епітелію ендометрія, а також у поліморфних лейкоцитах. Іншим важливим джерелом ферментів є макрофаги, нейтрофіли та еозинофіли, активізовані як наслідок запального стану низького ступеня, що спостерігається в черевній порожнині жінок з ендометріозом.

Невідомо, чи пов'язані концентрації цих ферментів (матричних металопротеїназ) лише з лапароскопічно видимими ендометріюідними ураженнями чи вони також змінені у пацієнтів з болем та / або безпліддям, але без чітко вираженого ендометріозу [233].

Тому ММР-2 та ММР-9, серед інших ММР, виявились особливо важливими факторами прогресування пухлини та інвазії ендометрія. Схема експресії (та її ступінь) даних ММП складають інтерес і при різних типах ендометріозу.

### 5.3 Гістологічне дослідження зразків дослідної та контрольної груп

Забір біологічного матеріалу для гістологічного дослідження проводили під час лапароскопії та під час гістероскопії або кюретажу матки у стерильний пластиковий контейнер згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.

Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному мікротомі робили гістологічні зрізи (в кількості від 2-х до 5-ти для кожного суб'єкту дослідження) товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксиліном і еозином.

Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Фотографування виконували за допомогою мікроскопа Olympus CX-21, цифрової камери Olympus C450 під'єднаної до персонального комп'ютеру.

При дослідженні зразків еутопічного ендометрія отриманих від суб'єктів дослідження з контрольної групи (рис. 5.5) спостерігали типову морфологічну картину для ендометрія у фазі проліферації, а саме: поверхневий шар, який містить стовпчастий епітелій, бідний на залози та має розвинуту строму (*compacta*) та глибокий шар, який багатий на залози, які мають закономірний розподіл та має відносно менш розвинуту строму, яка містить мезенхімальні клітини (*spongiosa*).

Еутопічний ендометрій отриманий від суб'єктів дослідження з дослідної групи морфологічно та візуально не мав суттєвих відмінностей з еутопічним ендометрієм контрольної групи (рис. 5.6).

Ектопічний ендометрій, отриманий від суб'єктів дослідження з дослідної групи (рис. 5.7) мав наступні морфологічні особливості порівняно з еутопічним: менш виражені та організовані залозисті елементи, незначне

переважання стромального компоненту та більш хаотичне розташування глибоких шарів клітин.

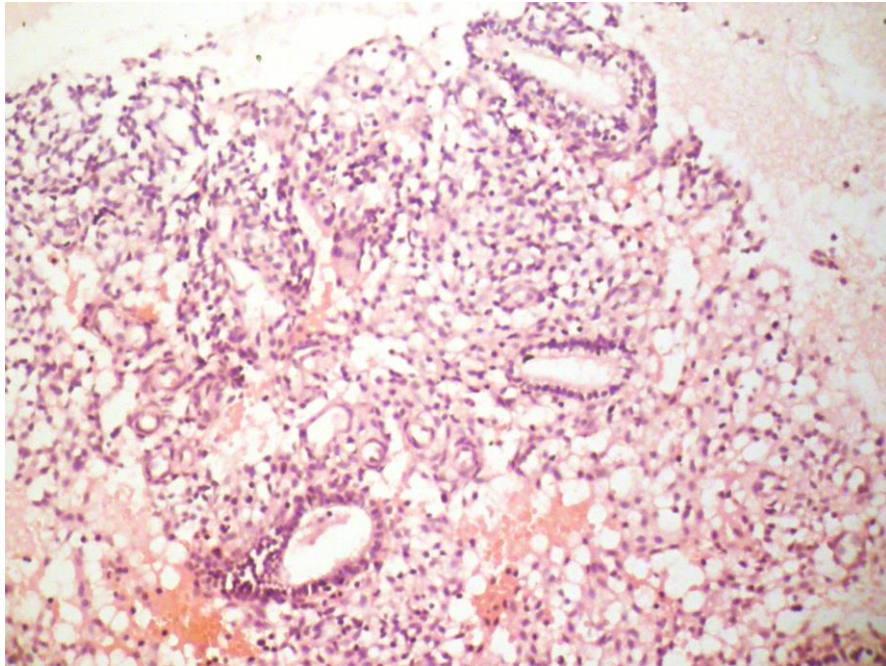


Рисунок 5.5 – Еутопічний ендометрій у контрольній групі.

Гематоксилін і еозин. Об.  $10^x$ , Ок.  $10^x$

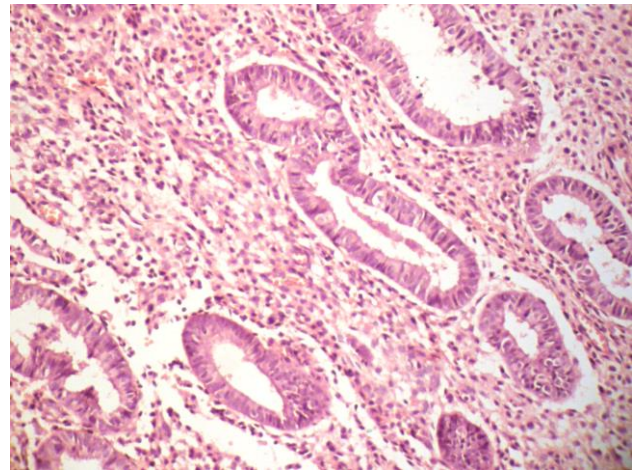
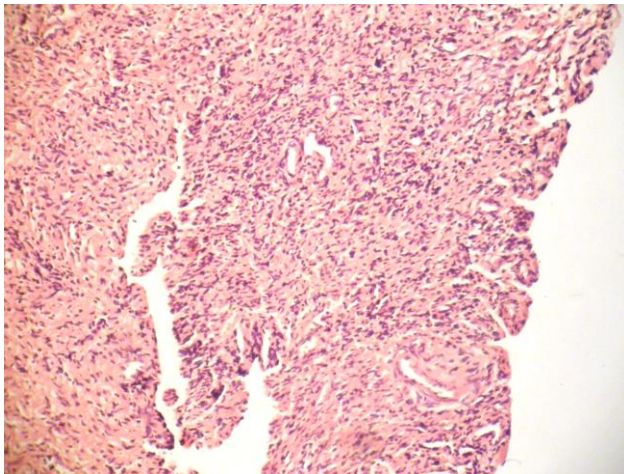


Рисунок 5.6 – Еутопічний ендометрій у дослідній групі.

Гематоксилін і еозин. Об.  $10^x$ , Ок.  $10^x$

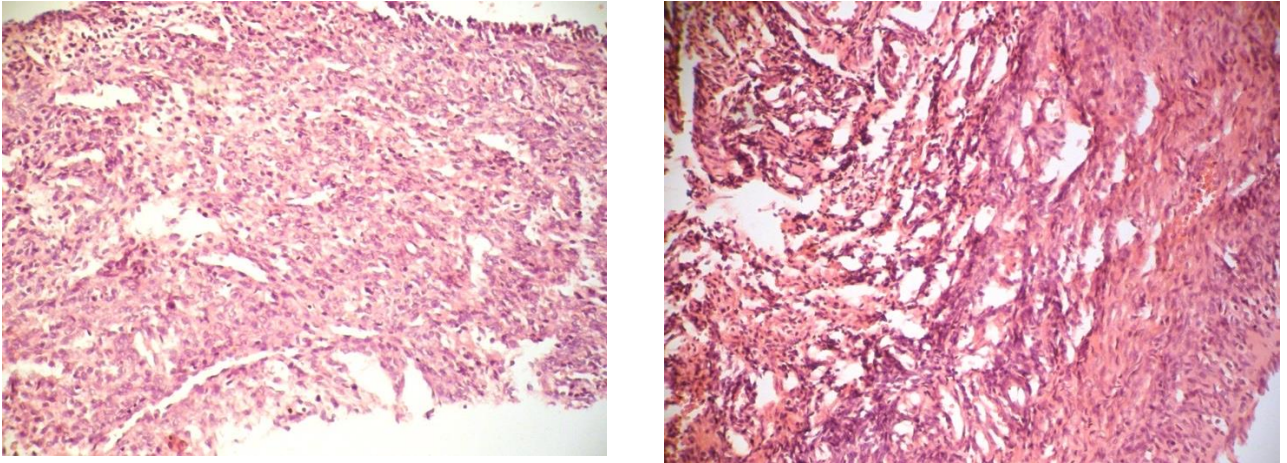


Рисунок 5.7 – Ектопічний ендометрій (ендометріоз) у дослідній групі.

Гематоксилін і еозин. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

З огляду на відсутність мікроскопічної морфологічної різниці між гістологічними зразками у еутопічному ендометрії жінок без ендометріозу та жінок з ендометріозом нами було вирішено не провести морфометрію ендометрія перед імуногістохімічним дослідженням.

5.4 Показники експресії матричних металопротеїназ (ММР-2 та ММР-9) у дослідній та контрольній групах (імуногістохімічне дослідження)

Після попереднього огляду мікропрепаратів забарвлених гематоксиліном та еозином для кожного суб'єкту дослідження виконували однотипні зрізи на санному мікротомі у кількості 3 шт. на кожен суб'єкт дослідження (ММР-2, ММР-9 та VEGFR-2), після чого виконували імуногістохімічне дослідження згідно протоколу виробника (Abscam).

В подальшому проводили фотографування імуногістохімічних препаратів за допомогою мікроскопа Olympus CX-21 та цифрової камери Olympus C450. Для аналізу імуногістохімічних зображень було застосовано програмне забезпечення ImageJ версії 1.48 та додаток до програмного забезпечення ІНС Profiler.

Як в еутопічному ендометрії контрольної (рис. 5.10), так і дослідної груп (рис. 5.8), позитивно зафарбовані ділянки ММР-2 розташувалися у вигляді груп



клітин у стромі та в субепітеліальній ділянці. В ектопічному ендометрії дослідної групи позитивні ділянки MMP-2 візуально мали більшу експресію та розташувалися переважно дифузно у стромальному компоненті (рис. 5.9).

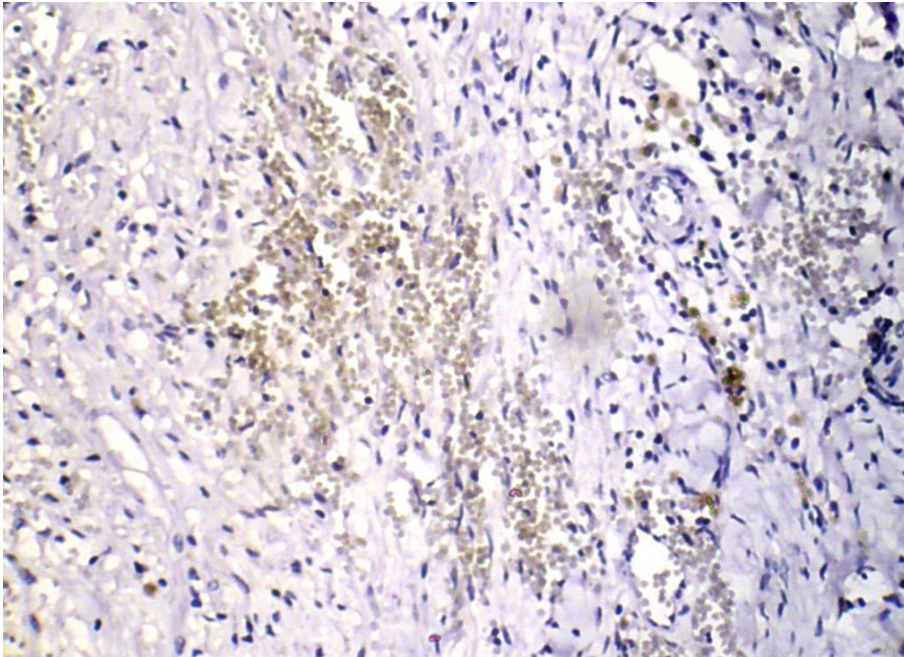


Рисунок 5.8 – MMP-2 у еутопічному ендометрії у дослідній групі.

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

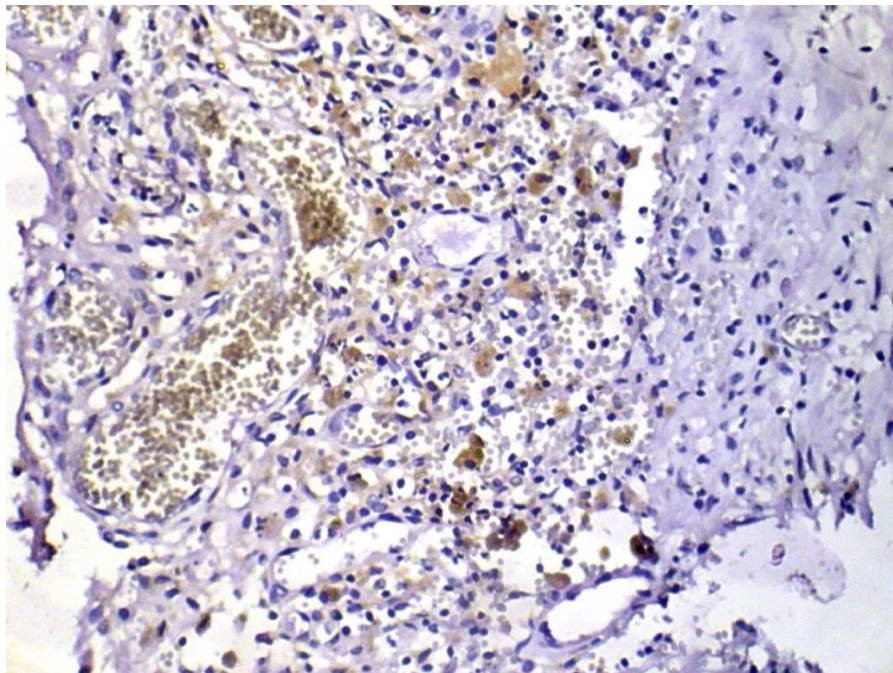


Рисунок 5.9 – MMP-2 у ектопічному ендометрії у дослідній групі.

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-2. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

При порівнянні експресії MMP-2 у еутопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявили, що експресія у дослідній групі достовірна вища, ніж у контрольній групі ( $1,77 \pm 0,22$  проти  $1,41 \pm 0,34$ ,  $p = 0,001$ ) (рис. 5.10).

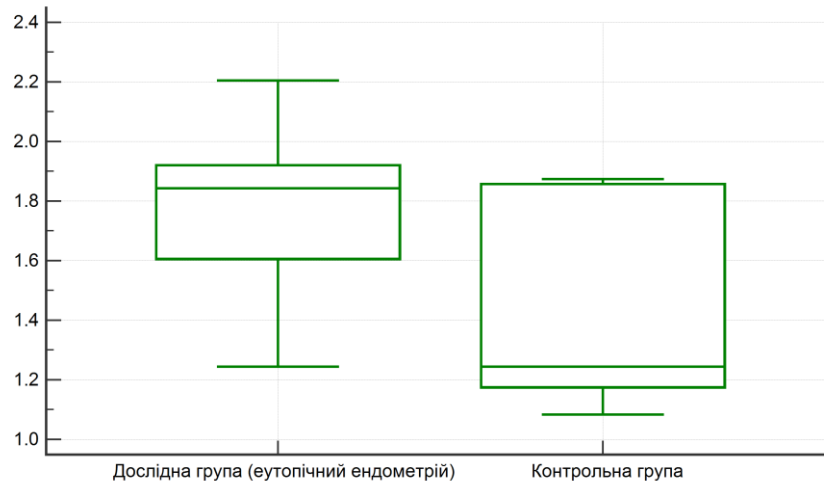


Рисунок 5.10 – Оптична щільність ІГХ MMP-2 еутопічного ендометрія у дослідній та контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,0017$ )

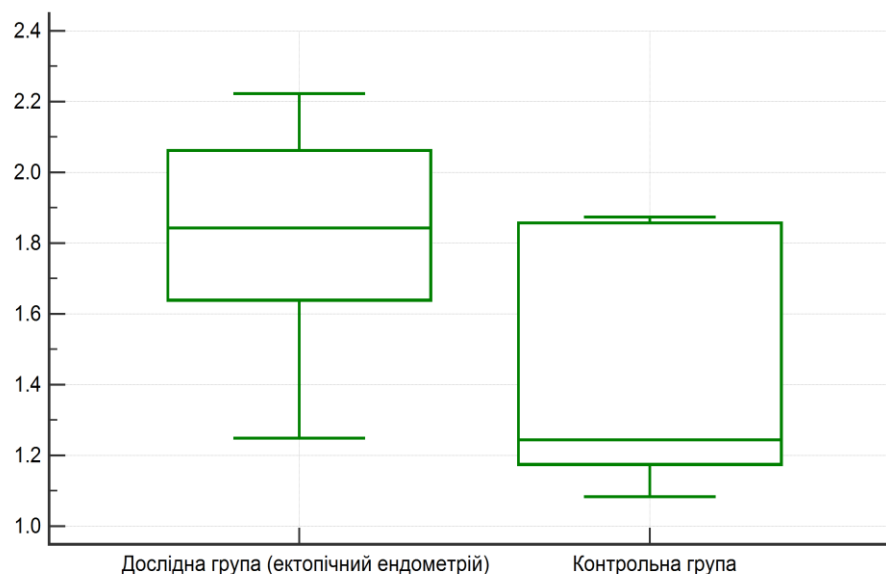
При порівнянні експресії MMP-2 у ектопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявили достовірну різницю у експресії на користь дослідної групи ( $1,82 \pm 0,27$  проти  $1,41 \pm 0,34$ ,  $p = 0,001$ ) (табл. 5.5). Натомість, при порівнянні експресії між ектопічним та еутопічним ендометрієм дослідної групи достовірної різниці не знайдено ( $p = 0,44$ ) (рис. 5.11).

Задля перевірки гіпотези щодо ендометріального походження металопротеїназ при зовнішньому генітальному ендометріозі нами була визначена кореляція експресії між еутопічним та ектопічним ендометрієм у дослідній групі [268]. Виявлена сильна кореляція між перерахованими тканинами ( $r = 0,740$  при  $p < 0,001$ ), що може підтвердити ендометріальне походження MMP-2 при зовнішньому генітальному ендометріозі (рис. 5.12).

Таблиця 5.5 – Імуногістохімічна експресія ММР-2 у дослідній та контрольній групах, оптична щільність ІГХ

| Тканина та група                        | Середня | 95% ДІ середньої | Медіана | 95% ДІ медіани | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | p                 |
|-----------------------------------------|---------|------------------|---------|----------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Еутопічний ендометрій, контрольна група | 1,41    | 1,19 – 1,62      | 1,24    | 1,16 – 1,86    | 0,34                  | 0,09               | -                 |
| Еутопічний ендометрій, дослідна група   | 1,77    | 1,69 - 1,85      | 1,84    | 1,69 – 1,89    | 0,22                  | 0,039              | 0,001*            |
| Ектопічний ендометрій, дослідна група   | 1,82    | 1,72 - 1,92      | 1,84    | 1,67 – 1,98    | 0,27                  | 0,048              | 0,001*<br>0,442** |

Примітка. \* – порівняно з контрольною групою; \*\* – порівняно з еутопічним ендометрієм дослідної групи.



Рисunek 5.11 – Оптична щільність ІГХ ММР-2 ектопічного ендометрія у дослідній та еутопічного ендометрія у контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,0014$ )

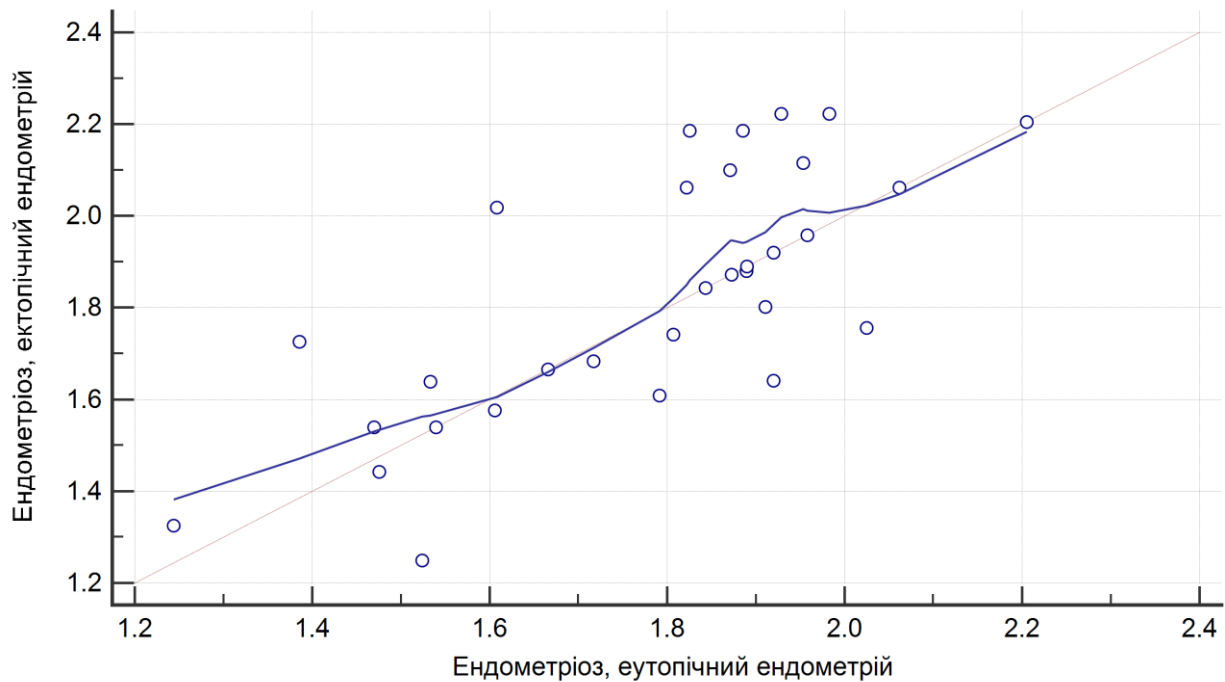


Рисунок 5.12 – Кореляційний зв'язок оптичної щільності ІГХ ММР-2 між ектопічним та еутопічним ендометрієм у дослідній групі  
( $r = 0,7401$  при  $p < 0,001$ )

В еутопічному ендометрії обох груп (дослідної та контролю) позитивно зафарбовані ділянки ММР-9 розташувалися у вигляді груп клітин у стромі та в субепітеліальній ділянці (рис. 5.13). В ектопічному ендометрії дослідної групи позитивні ділянки ММР-2 візуально не відрізнялися від дослідної групи, розташувалися переважно дифузно у стромальному компоненті (рис. 5.14).

Порівняння експресії ММР-9 у еутопічному ендометрії у дослідній групі та у еутопічному ендометрії контрольної групи виявила, що експресія у дослідній групі достовірна вища, ніж у контрольній групі ( $1,85 \pm 0,04$  проти  $1,35 \pm 0,02$ ,  $p = 0,001$ ) (рис. 5.15).

При порівнянні експресії ММР-9 у ектопічному ендометрії у дослідній групі та в еутопічному ендометрії контрольної групи виявили достовірну різницю у експресії на користь дослідної групи ( $1,87 \pm 0,05$  проти  $1,35 \pm 0,02$ ,  $p = 0,001$ ) (табл. 5.6). Натомість, при порівнянні експресії між ектопічним та

еутопічним ендометрієм дослідної групи достовірної різниці не знайдено ( $p = 0,81$ ) (рис. 5.16).

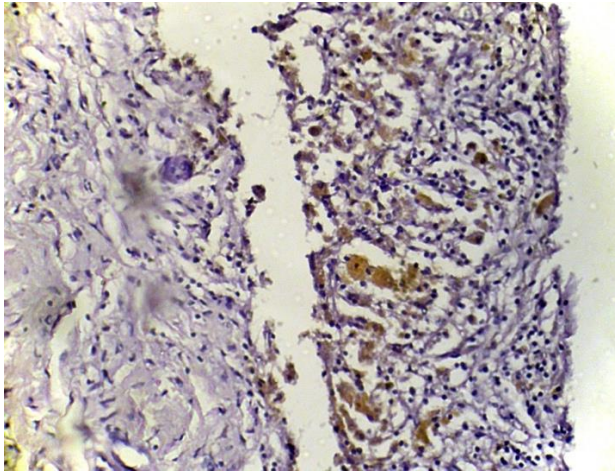


Рисунок 5.13 – MMP-9 у еутопічному ендометрії у дослідній групі.

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-9. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

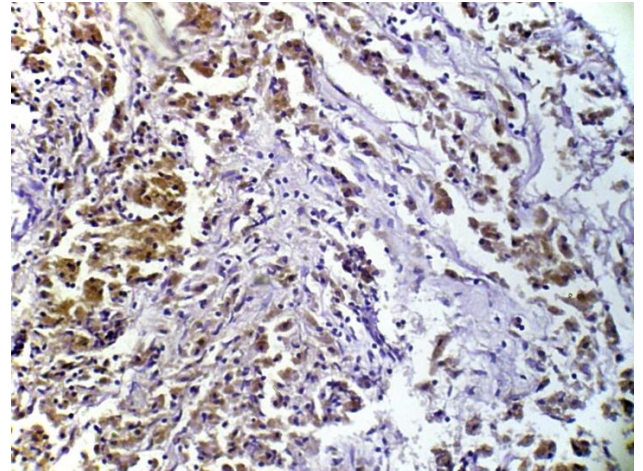


Рисунок 5.14 – MMP-9 у ектопічному ендометрії у дослідній групі.

Імуногістохімія, первинні антитіла до MMP-9. Об. $10^x$ , Ок.  $10^x$

Таблиця 5.6 – Імуногістохімічна експресія MMP-9 у дослідній та контрольній групах, оптична щільність ІГХ

| Тканина та група                        | Середня | 95% Ді середньої | Медіана | 95% Ді медіани | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | p       |
|-----------------------------------------|---------|------------------|---------|----------------|-----------------------|--------------------|---------|
| 1                                       | 2       | 3                | 4       | 5              | 6                     | 7                  | 8       |
| Еутопічний ендометрій, контрольна група | 1,35    | 1,31 – 1,39      | 1,32    | 1,29 – 1,38    | 0,067                 | 0,019              | -       |
| Еутопічний ендометрій, дослідна група   | 1,85    | 1,75 – 1,94      | 1,87    | 1,76 – 1,92    | 0,26                  | 0,047              | <0,001* |

## Продовження таблиці 5.6

| 1                                                                                                      | 2    | 3              | 4    | 5              | 6    | 7     | 8                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------|------|----------------|------|-------|--------------------|
| Ектопічний<br>ендометрій,<br>дослідна група                                                            | 1,87 | 1,76 –<br>1,98 | 1,88 | 1,79 –<br>1,95 | 0,30 | 0,054 | <0,001*<br>0,816** |
| Примітка. * – порівняно з контрольною групою; ** – порівняно з еутопічним ендометрієм дослідної групи. |      |                |      |                |      |       |                    |

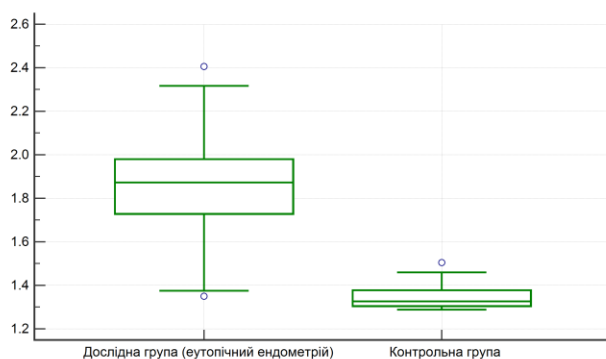


Рисунок 5.15 – Оптична щільність ІГХ MMP-9 еутопічного ендометрія у дослідній та контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,0001$ )

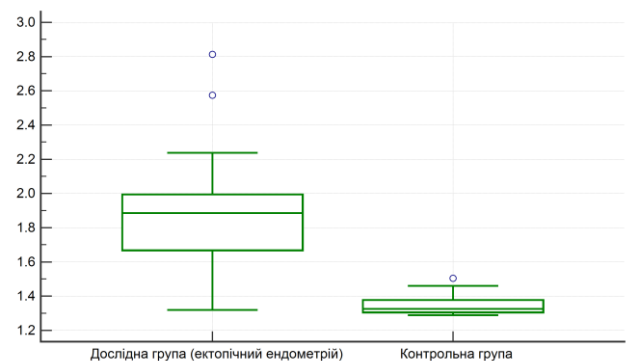


Рисунок 5.16 – Оптична щільність ІГХ MMP-9 ектопічного ендометрія у дослідній та ектопічного ендометрія у контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,0001$ )

Задля перевірки гіпотези щодо ендометріального походження металопротеїназ, зокрема MMP-9, при зовнішньому генітальному ендометріозі нами була визначена кореляція експресії між еутопічним та ектопічним ендометрієм у дослідній групі. Виявлена сильна кореляція між перерахованими тканинами ( $r = 0,887$  при  $p < 0,001$ ), що може підтвердити ендометріальне походження MMP-9 при зовнішньому генітальному ендометріозі (рис. 5.17).

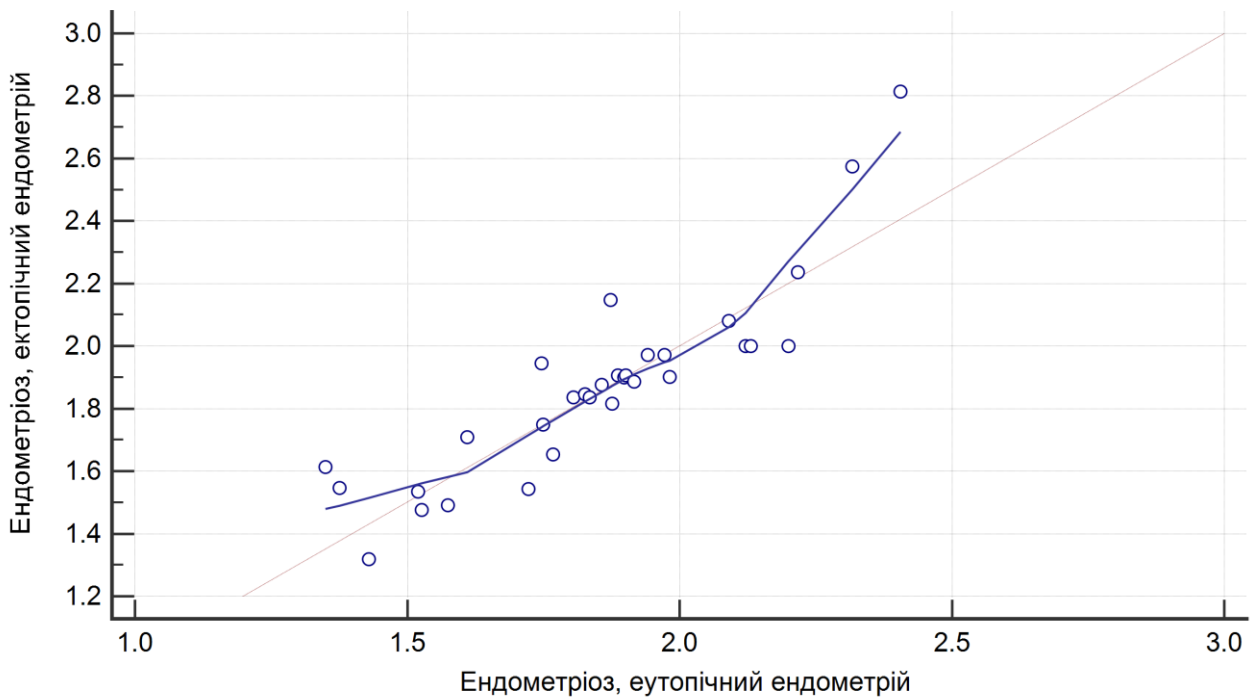


Рисунок 5.17 – Кореляційний зв'язок оптичної щільності ІГХ MMP-9 між ектопічним та еутопічним ендометриєм у дослідній групі  
( $r = 0,887$  при  $p < 0,001$ )

#### 5.5 Показники експресії рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту (VEGFR-2) у дослідній та контрольній групах

При визначенні експресії рецепторів VEGFR-2 до VEGF у ектопічному ендометрії дослідної групи виявили поодинокі групи позитивних клітин, які розташувалися в стінках судин або в перивазальній мезенхімі (рис. 5.18, 5.19). Однак, в еутопічному ендометрії, як дослідної, так і контрольної групи лише для декількох суб'єктів дослідження були виявлені поодинокі (1-2) позитивні клітини, що може свідчити про мінімальну експресію рецепторів VEGFR-2 в даних тканинах [259].

Враховуючи малу кількість позитивних VEGFR-2 клітин нами був обраний метод прямого підрахунку позитивних клітин на гістологічний препарат з метою об'єктивізації імуногістохімічного дослідження.

Отримані дані по VEGFR-2 представлені в таблиці 5.7.

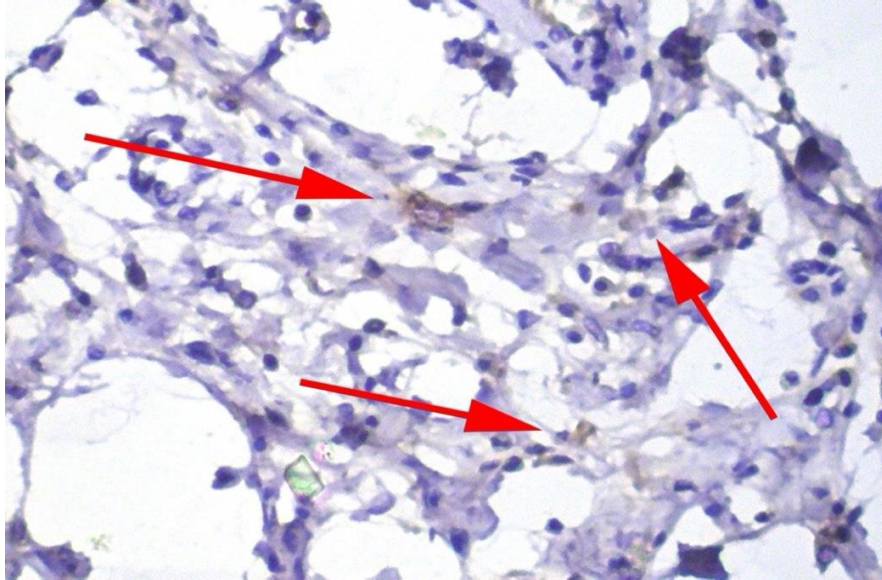


Рисунок 5.18 – VEGFR-2 у ектопічному ендометрії дослідної групи.  
Імуногістохімія, первинні антитіла до рецепторів VEGFR-2.  
Стрілками вказані ділянки забарвлення. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

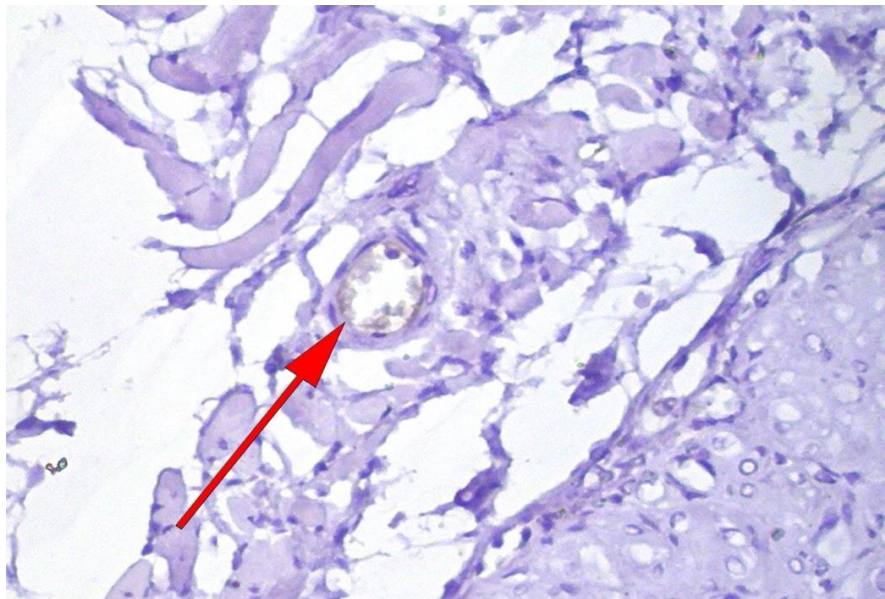


Рисунок 5.19 – VEGFR-2 у ектопічному ендометрії дослідної групи.  
Імуногістохімія, первинні антитіла до рецепторів VEGFR-2.  
Стрілкою вказаний новоутворений капіляр в якому наявні VEGFR-2  
позитивні клітини. Об.40<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>



Таблиця 5.7 – Імуногістохімічна експресія VEGFR-2 у дослідній та контрольній групах, кількість позитивних клітин в імуногістохімічному препараті, кількість клітин

| Тканина та група                                                                                       | Середня | 95% ДІ середньої | Медіана | 95% ДІ медіани | Стандартне відхилення | Стандартна помилка | p                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------|---------|----------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Еутопічний ендометрій, контрольна група                                                                | 0,33    | -0,08 – 0,74     | 0,01    | 0,00 – 0,82    | 0,65                  | 0,18               | -                  |
| Еутопічний ендометрій, дослідна група                                                                  | 0,19    | 0,04 – 0,34      | 0,01    | 0,00 – 0,22    | 0,40                  | 0,07               | 0,62*              |
| Ектопічний ендометрій, дослідна група                                                                  | 5,64    | 4,02 – 7,26      | 4,00    | 2,00 – 7,82    | 4,41                  | 0,79               | <0,001*<br>0,001** |
| Примітка. * – порівняно з контрольною групою; ** – порівняно з еутопічним ендометрієм дослідної групи. |         |                  |         |                |                       |                    |                    |

Вони свідчать про достовірну різницю між експресією у еутопічному та ектопічному ендометрії в групі досліду (рис. 5.20), відсутність достовірної різниці між еутопічним ендометрієм групи контролю та досліду (рис. 5.21), а також про відсутність будь-якої кореляції експресії VEGFR-2 в еутопічному та ектопічному ендометрії при ендометріозі. Отримані нами дані підтверджують гіпотезу про перитонеальне походження (макрофаги та дендритні клітини) VEGF-A [269].

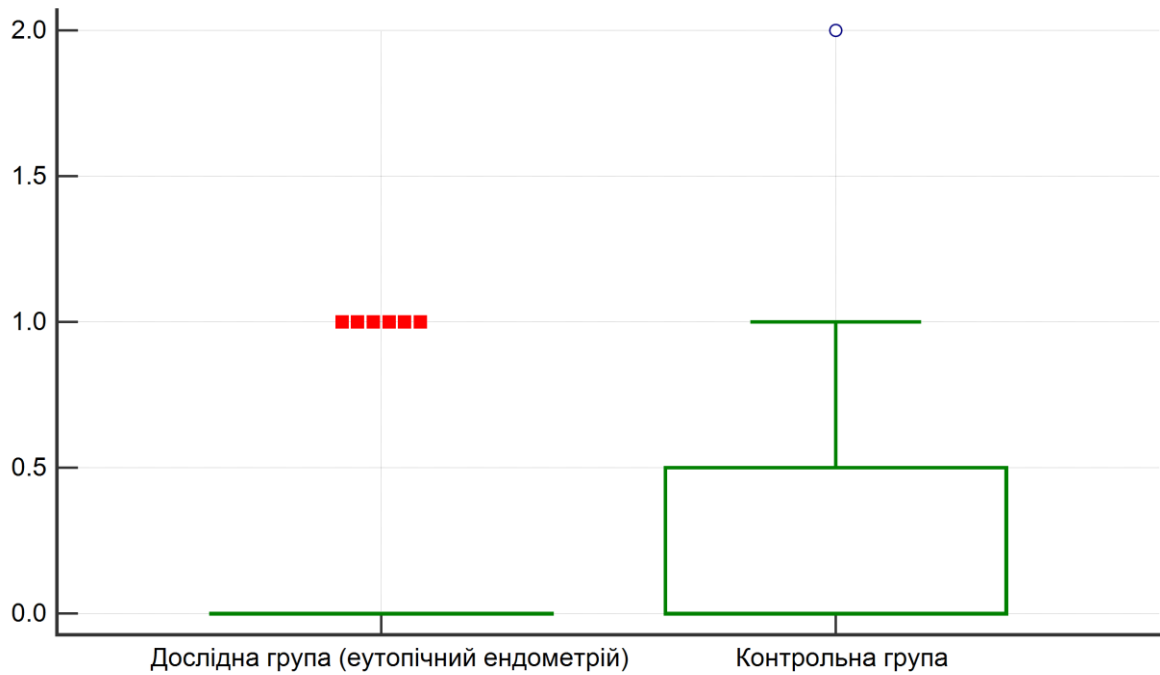


Рисунок 5.20 – Кількість імуно-позитивних клітин ІГХ VEGFR-2 еутопічного ендометрія у дослідній та контрольній групі (достовірність різниці  $p = 0,62$ )



Рисунок 5.21 – Кількість імуно-позитивних клітин ІГХ VEGFR-2 ектопічного ендометрія у дослідній та ектопічного ендометрія у контрольній групі (достовірність різниці  $p < 0,0001$ )

## 5.6 Регресійний аналіз отриманих даних

На основі отриманих нами клініко-лабораторних та імуногістохімічних даних ми оцінили ймовірний вплив кожного фактора, який детермінує наявність або відсутність ендометріозу. Для цього ми застосували логістичну регресію – статистичну модель, яка використовується для прогнозування вірогідності виникнення тієї чи іншої події шляхом її порівняння з логістичною кривою [270]. Даний вид регресії видає свою відповідь у вигляді вірогідності бінарної події. Бінарною подією (або залежною змінною) у нашому випадку була ознака наявності чи відсутності ендометріозу. Незалежними змінними (фактори, які впливають на бінарну подію) виступили: вік, кількість вагітностей, рівень у венозній крові СА-125 (виражено у Од/мл), рівень у венозній крові HE4 (виражено у пмоль/л), рівні оптичної густини ІГХ для MMP-2 та MMP-9. Способом внесення змінних для статистичної моделі логістичної регресії був вибраний метод “Enter”, який полягає у тому, що всі вхідні параметри для моделювання вносяться одночасно. Ми вважаємо недоцільним використання методу “forward stepwise” (при якому вхідні параметри для моделювання вносяться по одному доти доки внесення наступного параметру не впливає на вірогідність прогнозу) або “backward stepwise” (при якому вхідні параметри спочатку вносяться всі, а потім видаляються по одному доти доки вірогідність прогнозу не погіршується), так як за даними літератури а priori відомо, що наявність або відсутність ендометріозу статистично не обумовлена одним параметром.

Як видно з таблиці 5.5, в регресійній моделі немає окремого детермінуючого параметра ( $p$  дорівнює більше 0,05 у всіх випадках), проте домінуючими параметрами, які прямо пропорційно впливають на вірогідність наявності ендометріозу є підвищений рівень СА-125, підвищена експресія MMP-2 та, зокрема, підвищена експресія MMP-9.

Таблиця 5.5 – Коефіцієнти регресії та їх вірогідність

| Параметр                       | Коефіцієнт регресії | p    |
|--------------------------------|---------------------|------|
| Вік                            | -0,118              | 0,49 |
| Кількість вагітностей          | -0,915              | 0,54 |
| СА-125                         | 0,107               | 0,17 |
| HE4                            | 0,037               | 0,53 |
| ММР-2 у еутопічному ендометрії | 0,52                | 0,85 |
| ММР-9 у еутопічному ендометрії | 1,92                | 0,61 |

Обернено пропорційно впливають (чим більше, тим менша ймовірність наявності ендометріозу) такі параметри, як кількість вагітностей та вік. Отримані коефіцієнти регресії чітко корелюють з відношенням шансів для перерахованих вхідних параметрів (табл. 5.6).

Таблиця 5.6 – Відношення шансів для параметрів регресійної моделі

| Параметр              | Відношення шансів<br>(OR) | Довірчий інтервал 95% |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Вік                   | 0,88                      | 0,6334 до 1,2451      |
| Кількість вагітностей | 0,40                      | 0,0214 до 7,50        |
| СА-125                | 1,11                      | 0,9528 до 1,30        |
| HE4                   | 1,03                      | 0,9208 до 1,17        |
| ММР-2                 | 1,69                      | 0,0066 до 436,94      |
| ММР-9                 | 6,82                      | 0,0038 до 12409,90    |

На основі проведеного логістичного регресійного аналізу нами були отримані значення прогнозованої ймовірності (від 0 до 1), які є синтетичними показниками. На основі даних показників ми побудували ROC-криву за методикою DeLong et al. (1988) [271] (рис. 5.22).

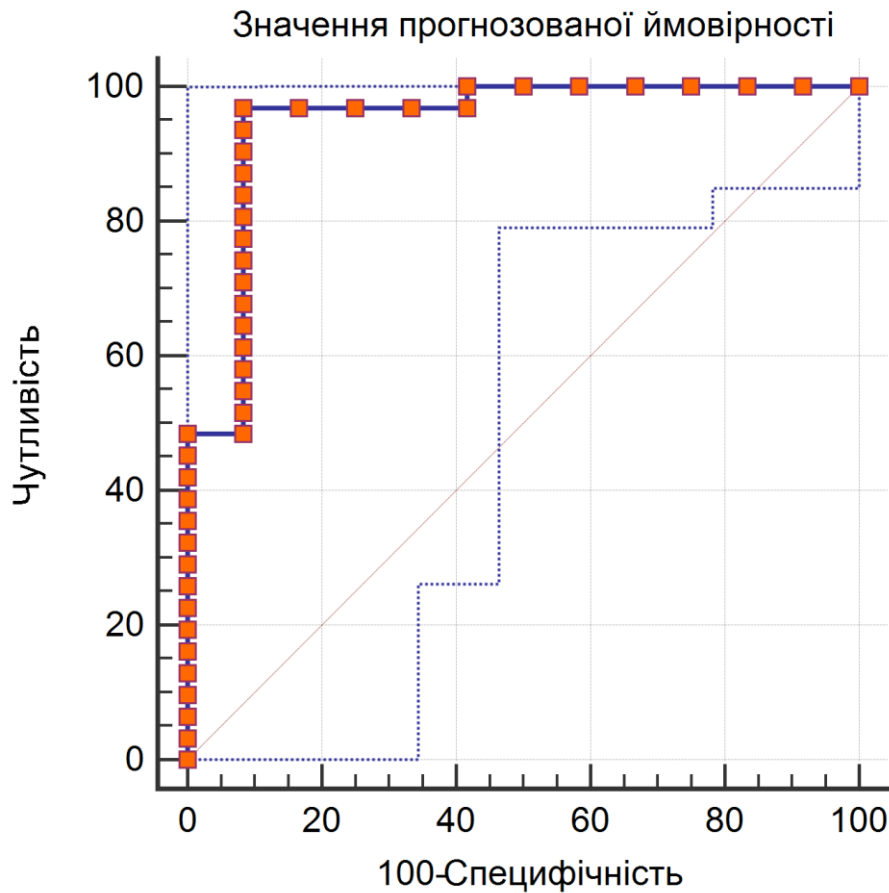


Рисунок 5.22 – ROC-крива побудована на основі значення прогнозованої ймовірності

Як бачимо з таблиці 5.7, площа під ROC-кривою (AUROC)  $> 0,9$ . Це означає, що даний комплексний тест має хорошу точність.

Таблиця 5.7 – Дані ROC-кривої для значення прогнозованої ймовірності.

| Критерій                                           | Значення |
|----------------------------------------------------|----------|
| AUROC (area under ROC curve, площа під ROC-кривою) | 0,926    |
| Стандартна помилка                                 | 0,04     |
| Чутливість                                         | 92,77    |
| Специфічність                                      | 90,67    |

Чутливість відноситься до пропорції суб'єктів, які мають цільовий стан та мають позитивний результат тесту.

Специфічність – це пропорція суб'єктів, які не мають цільового стану та мають негативний результат тесту.

Отримані нами значення чутливості та специфічності дозволяють використовувати запропоновану регресійну модель, як основу для комплексного діагностичного критерію ранньої діагностики ендометріозу.

### **Висновки:**

1. Визначається достовірна різниця в експресії MMP-2 між дослідною та контрольною групою, як при порівнянні експресії MMP-2 у ектопічному ендометрії, так і у еутопічному ендометрії порівняно з контрольною групою (еутопічний ендометрій).

2. Схожа та більш виразна тенденція у експресії MMP-9 порівняно з MMP-2. Експресія MMP-9 у дослідній (ектопічний та еутопічний ендометрій) групі достовірно вища, аніж у контрольній групі (еутопічний ендометрій).

3. Визначили достовірну різницю між експресією VEGFR-2 рецепторів у ектопічному ендометрії дослідної групи та контрольної групи. Проте, не виявили різниці у межах дослідної групи між ектопічним та еутопічним ендометрієм. Це може вказувати на те, що активація VEGFR-2 рецепторів відбувається *ad hoc* у ендотеліальних клітинах, які мігрують в місце асептичного запалення в очеревині з метою неоангіогенезу.

4. Встановили чітку кореляцію між експресією MMP-2 та MMP-9 у ектопічному та еутопічному ендометрії у дослідній групі. Це вказує на зазделегідь визначену схильність еутопічного ендометрія до агресії щодо перитонеального позаклітинного матриксу. В контексті гіпотези ретроградної менструації Семпсона отримані нами дані є логічними з точки зору патофізіологічних механізмів формування ендометріюїдних ектопій.

Матеріали даного розділу викладено в наукових публікаціях автора [255, 257, 268].

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою отримання валідної моделі перитонеального ендометріозу на самках білих щурів було встановлення ефективності застосування агоністів дофаміну та високоселективних інгібіторів ЦОГ-2 задля отримання даних стосовно ефективності та перспективності впливу на VEGF-2-індукований та ЦОГ-2-індукований ангіонеогенез при ендометріозі.

В експерименті прийняли участь 83 статевозрілих нелінійних білих щура жіночої статі масою 170-200 г, які ще не народжували, віком 14-17 тижнів.

Усі маніпуляції з тваринами виконано згідно рекомендацій Міжурядового комітету з біоетики UNESCO (IGBC).

Перед початком дослідів усі щурі перебували протягом 2-ох тижнів в умовах віварію з метою адаптації.

Після завершення періоду адаптації, починаючи з першого дня дослідів, щурам було уведено підшкірно, в ділянці спини, по 0,06 мг/кг маси тіла естрадіолу валерату. Ін'єкцію естрадіолу валерату у дозі 0,06 мг/кг було повторно виконано на третій день дослідів.

На третій день дослідів було виключено останнє харчування, також як і в першій половині четвертого дня.

На четвертий день дослідів було виконано експериментальну індукцію ендометріозу шляхом оперативного втручання та імплантації аутологічного фрагменту матки за методикою А. Golan та співавт. [108] та Т.Hirata та співавт. [122]. Внаслідок ускладнень знечулення загинуло 3 тварини.

Щурам усіх груп проводилася естрогенна підтримка експериментальної моделі ендометріозу у вигляді щоденних підшкірних ін'єкцій у дозі 0,03 мг/кг маси тіла естрадіолу валерату до останнього дня дослідів.

Усі тварини були поділені на 4 групи: контрольна група (20 тварин) та 3 дослідні групи (застосування агоніста дофамінових рецепторів, високоселективного інгібітора ЦОГ-2 та агоніста дофамінових рецепторів й високоселективного інгібітора ЦОГ-2 одночасно) відповідно по 20, 19 та 21 тварину.

На 26-ий день досліду (22-ий день після оперативного втручання) було виконано евтаназію шляхом декапітації з використанням тіопенталового знечулення у дозі 5-7 мг/кг маси тіла тварини.

Одразу після евтаназії з використанням тіопенталового знечулення проводили макроскопічну оцінку типу уражень та їх морфометрію (розміри уражень, на основі чого згодом вираховували їх об'єм). Згодом, після забору матеріалу та його фіксації відповідно до загальноприйнятих правил виконували гістологічні зрізи, які фотографували. На основі цифрових фотографій проводили морфометричну оцінку отриманих результатів, а саме вимірювали: висоту секреторних епітеліоцитів, висоту їх секреторного полюса, площу ядра, денситометрію ядра та клітини в цілому.

При порівнянні характеру уражень (рис. 6.1) визначили, що найменше кістозних ендометріоїдподібних утворень виникало при застосуванні СВГ. Застосування іСОХ окремо та в комплексі з СВГ виявили меншу ефективність щодо даного параметру.

При порівнянні середніх найбільшого (рис. 6.2) та найменшого (рис. 6.3) діаметру уражень, а виходячи з цих показників й об'єму утворень (рис. 6.4) визначили, що найкращі результати показало застосування СВГ окремо. Об'єм уражень при застосуванні СВГ майже в 9 разів менший порівняно з контрольною групою. Варто зазначити, що об'єм уражень при застосуванні комбінації СВГ + іСОХ майже в 3,5 разів менший порівняно з контролем. Достовірна різниця об'єму уражень в сторону зменшення й при застосуванні іСОХ окремо, проте менш виражена (дещо більше 2-ох разів).



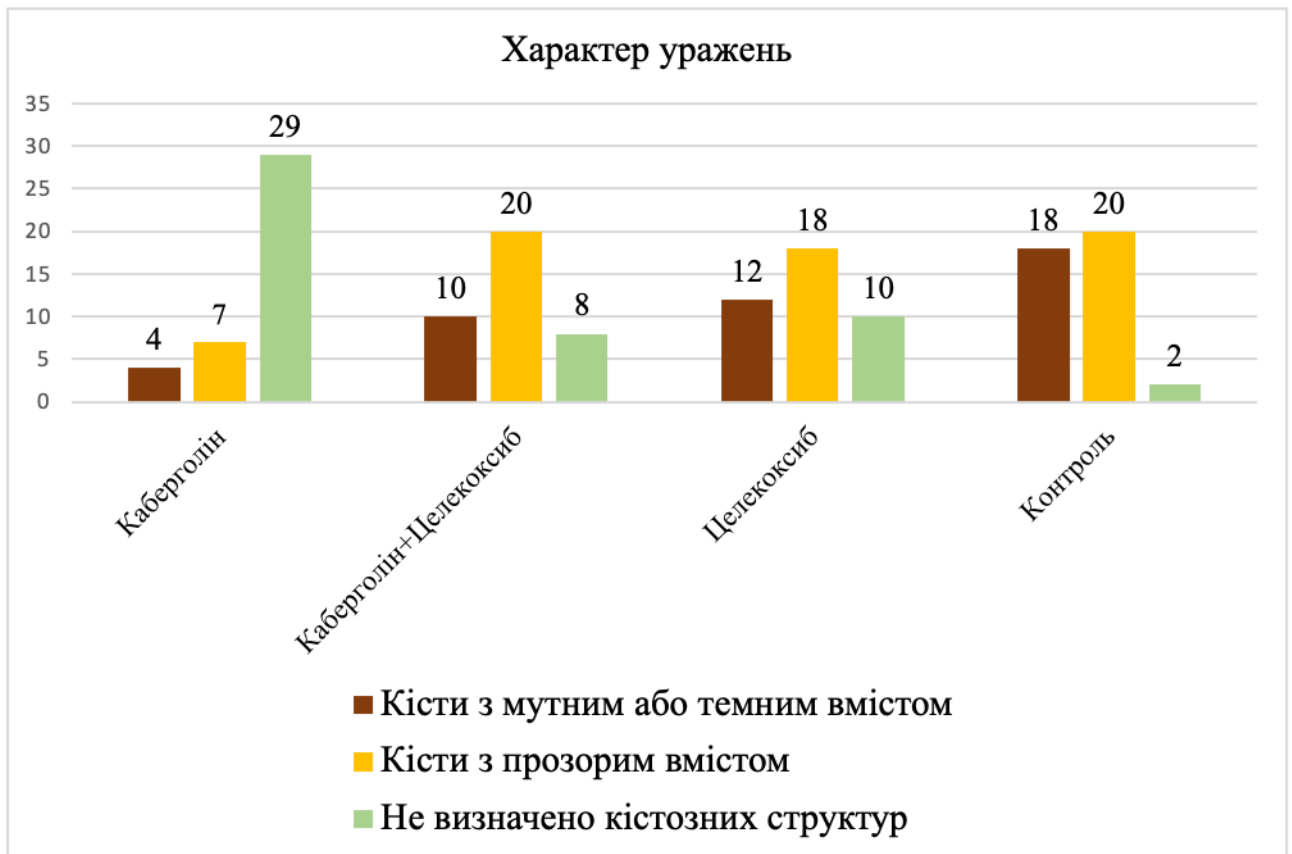


Рисунок 6.1 – Макроскопічний характер ендометріюїдних уражень

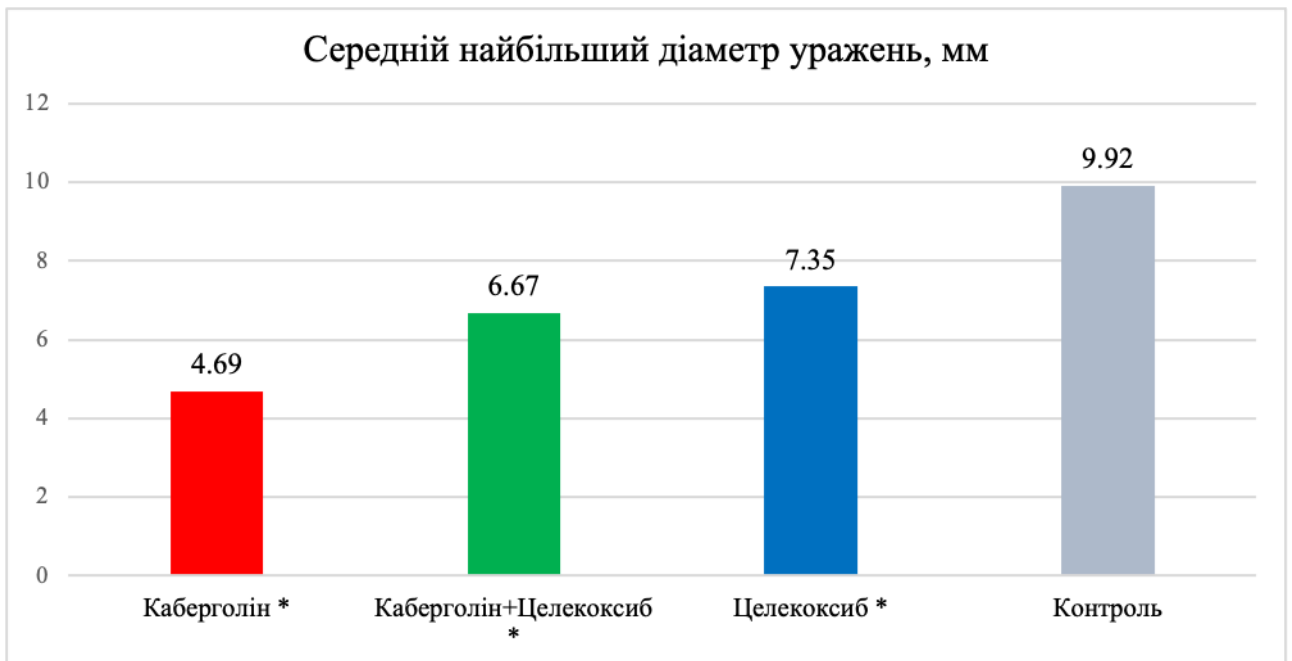


Рисунок 6.2 – Середній найбільший діаметр ендометріюїдних уражень, мм. \*

$p < 0,0001$

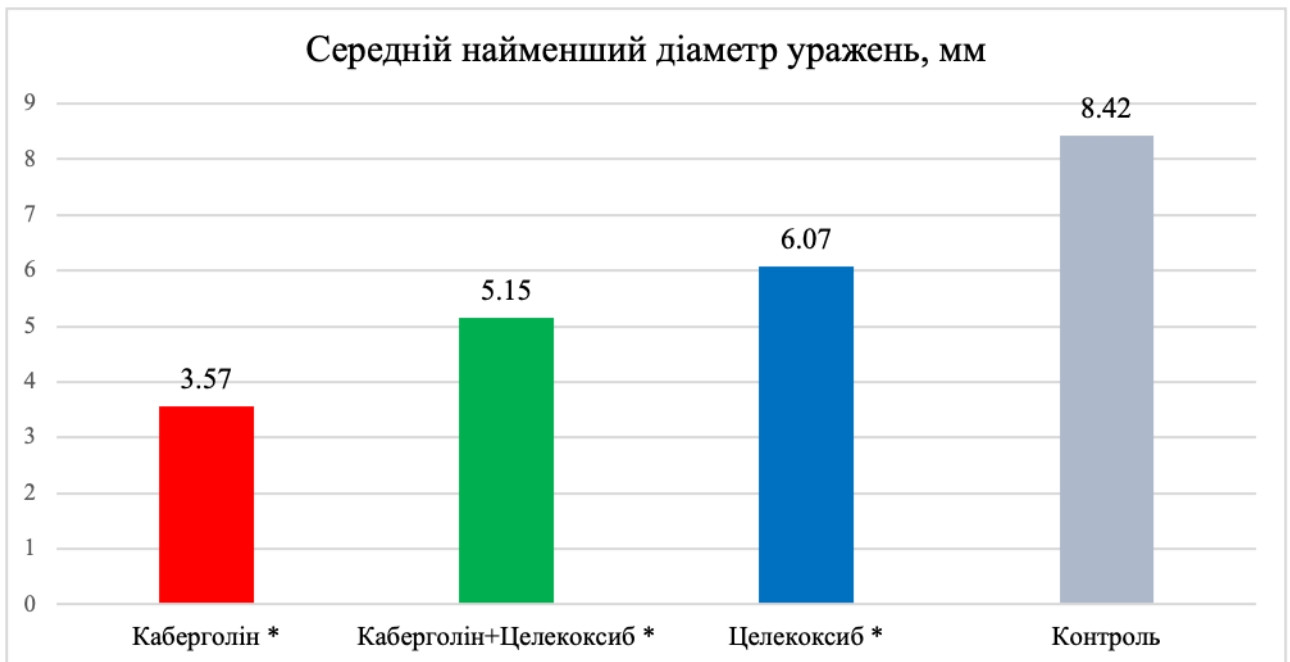


Рисунок 6.3 – Середній найменший діаметр уражень, мм. \*  $p < 0,0001$

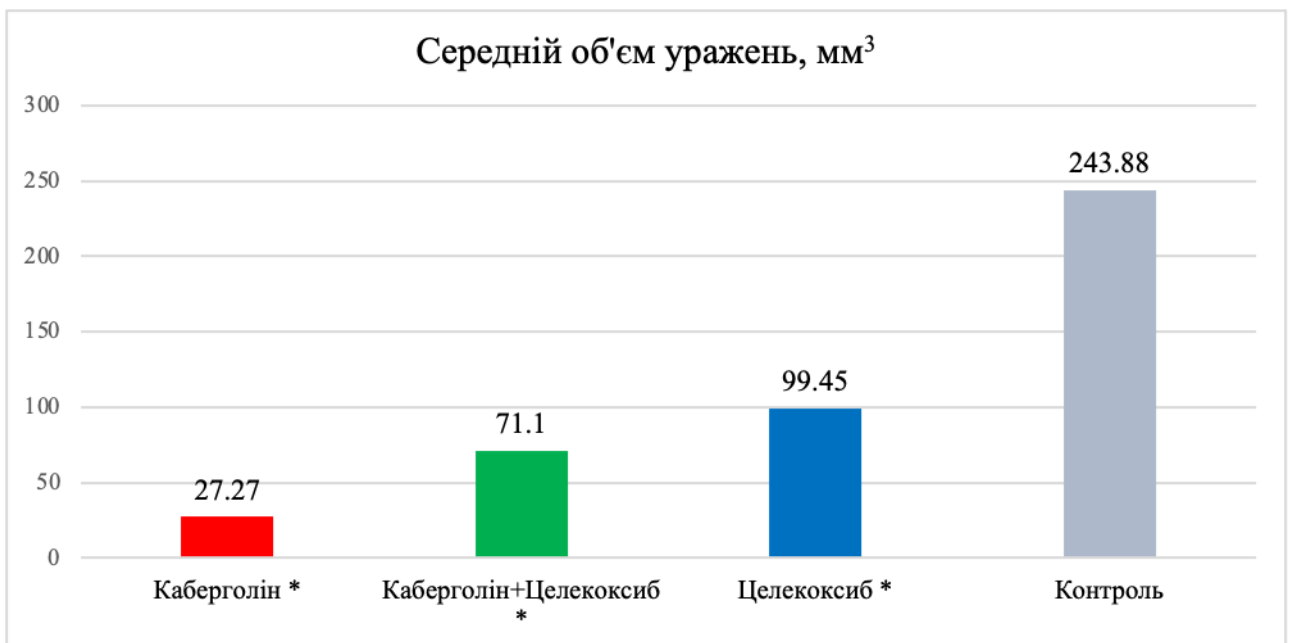


Рисунок 6.4 – Середній об'єм уражень, мм<sup>3</sup>. \*  $p < 0,0001$

При статистичній обробці та аналізі морфометричного дослідження отриманих гістологічних препаратів отримали наступне.

Висота секреторних ендометріюїдних епітеліоцитів достовірно ( $p < 0,0001$ ) була менша лише у випадку застосування СВГ. У випадку

застосування СВГ й іСОХ в комплексі та іСОХ окремо достовірної різниці знайдено не було (рис. 6.5). Варто зазначити, що розмір еутопічних епітеліоцитів менший чим в контрольній групі тварин, проте розміри ектопічних епітеліоцитів при застосуванні СВГ є меншими чим в еутопічному ендометрії.

При розгляді даних щодо секреторної частини епітеліоцитів (рис. 6.6) виявлено подібну закономірність: достовірне зменшення спостерігалось лише при використанні СВГ. У випадку використання іСОХ достовірної різниці знайдено не було, а у випадку використання СВГ та іСОХ у комплексі виявлено достовірне збільшення секреторної частини епітеліоцитів. Висота секреторної частини у зразках еутопічного ендометрія була дещо меншою чим в контрольній групі.

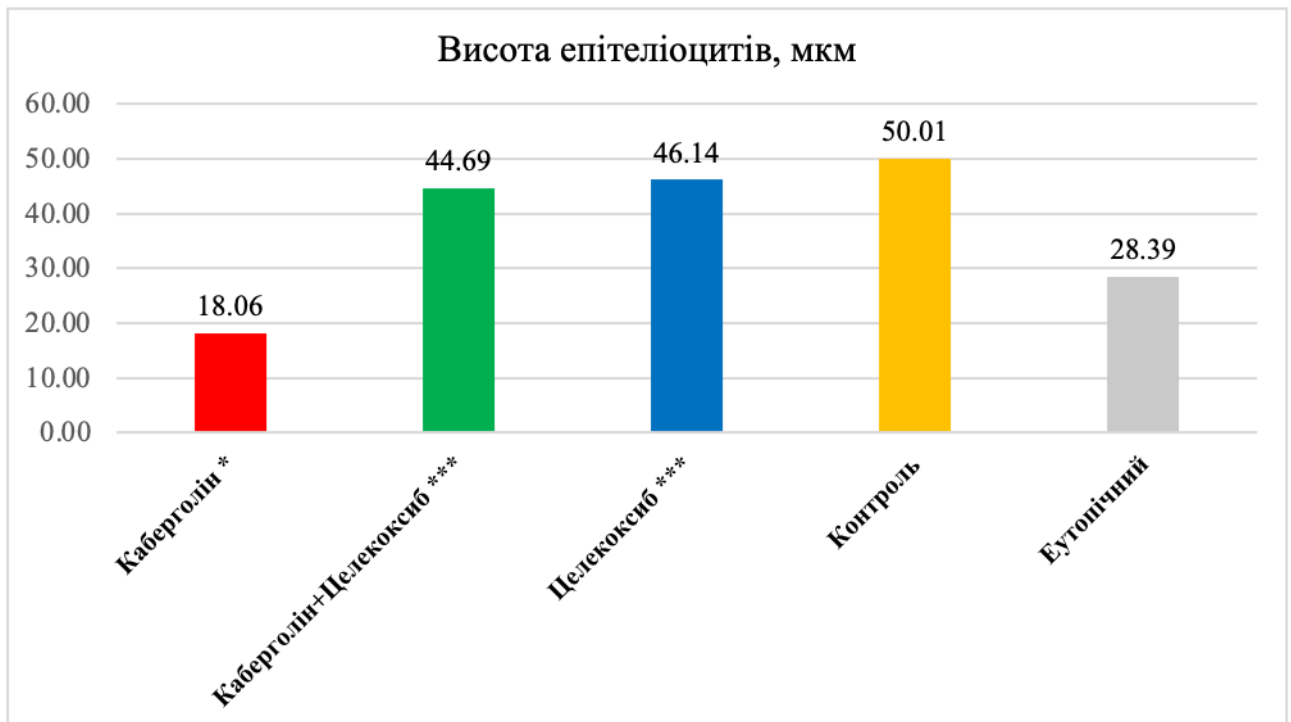


Рисунок 6.5 – Висота епітеліоцитів, мкм. \*  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p > 0,05$

Визначена площа ядра епітеліоцитів (рис. 6.7) була достовірно меншою у всіх досліджуваних групах (без достовірної різниці між досліджуваними групами) порівняно із контролем. При морфометрії зразків контрольної групи тварин виявили компактніше ядро порівняно із еутопічним ендометрієм.

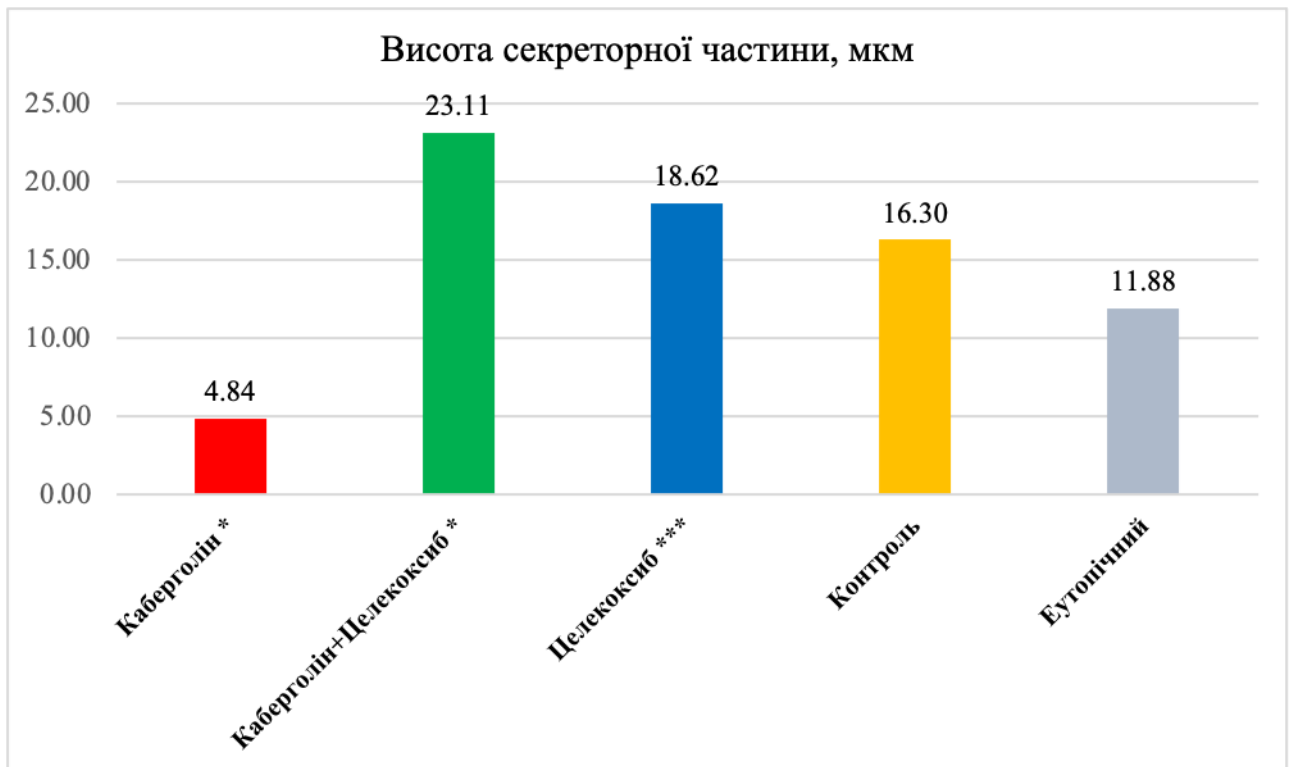


Рисунок 6.6 – Висота секреторної частини епітеліоцитів, мкм. \* –  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p > 0,05$



Рисунок 6.7 – Площа ядра епітеліоцитів, мкм<sup>2</sup>. \* –  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p > 0,05$

Відносна (денситометрична) щільність ядер епітеліоцитів достовірно ( $p < 0,05$ ) вища, що вказує на меншу компактизацію ядер, у всіх досліджуваних групах (рис. 6.8), порівняно із контрольною групою, проте фактично дорівнює відносній щільності ядер еутопічних епітеліоцитів.

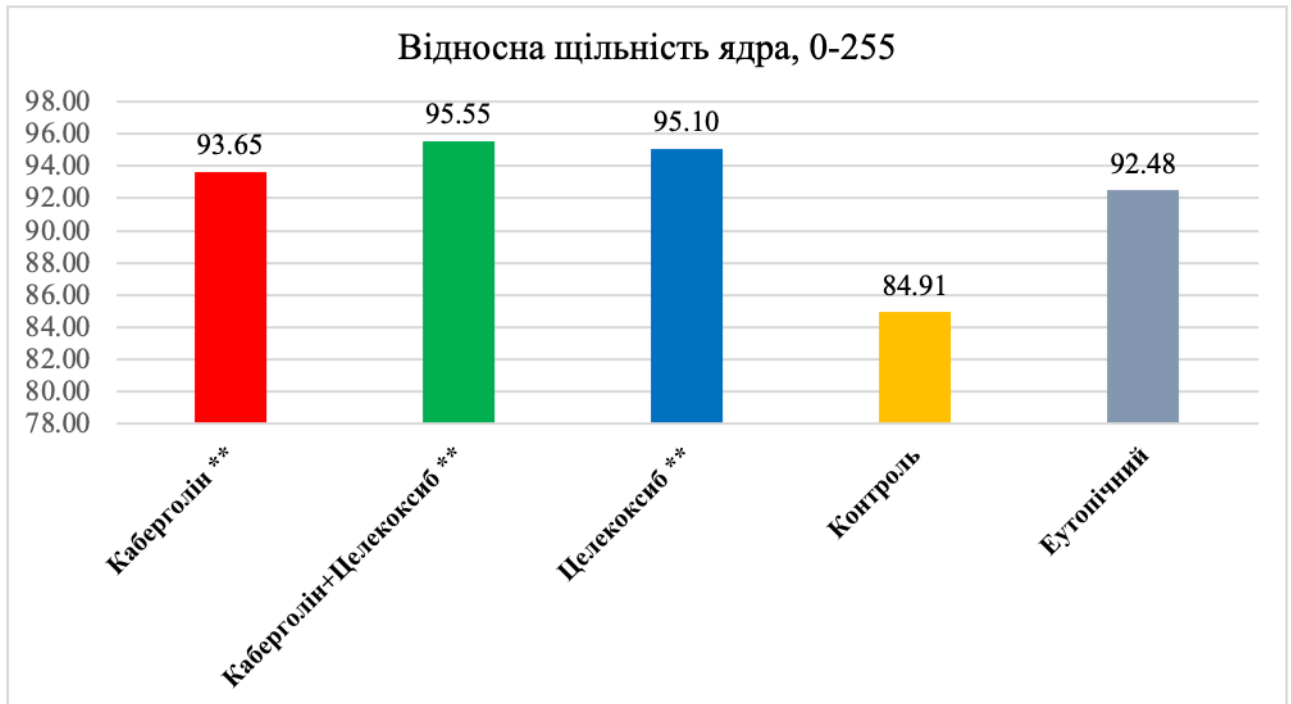


Рисунок 6.8 – Відносна щільність ядра, 0-255. \* –  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p > 0,05$

Визначення відносної щільності епітеліоцитів (рис. 6.9) не виявило достовірної різниці ( $p > 0,05$ ) між досліджуваними групами та контрольною групою.

Виходячи з вищенаведених даних, нами висунуті наступні припущення.

Згідно даних сучасної літератури, ми припускаємо, що ефективність (відповідно до визначених показників) застосування СВГ при експериментальному ендометріозі порівняно із групою контролю викликана його прямою дією на дофамінові рецептори D2, які у свою чергу, через аденилатциклазний шлях, активують фосфорилування VEGF-рецепторів та їхню інтернізацію, що безпосередньо блокує дію VEGF, а це в свою чергу

призводить до пригнічення ангиогенезу. За неможливості утворити нові судини, при дефіциті поживних речовин та кисню, ектопічний ендометріоїдний імплант не має можливостей для подальшого розвитку та секреторної активності. Це підтверджується даними про зменшення епітеліоцитів та їх секреторних полюсів у розмірах, а також компактизацією ядер епітеліоцитів.

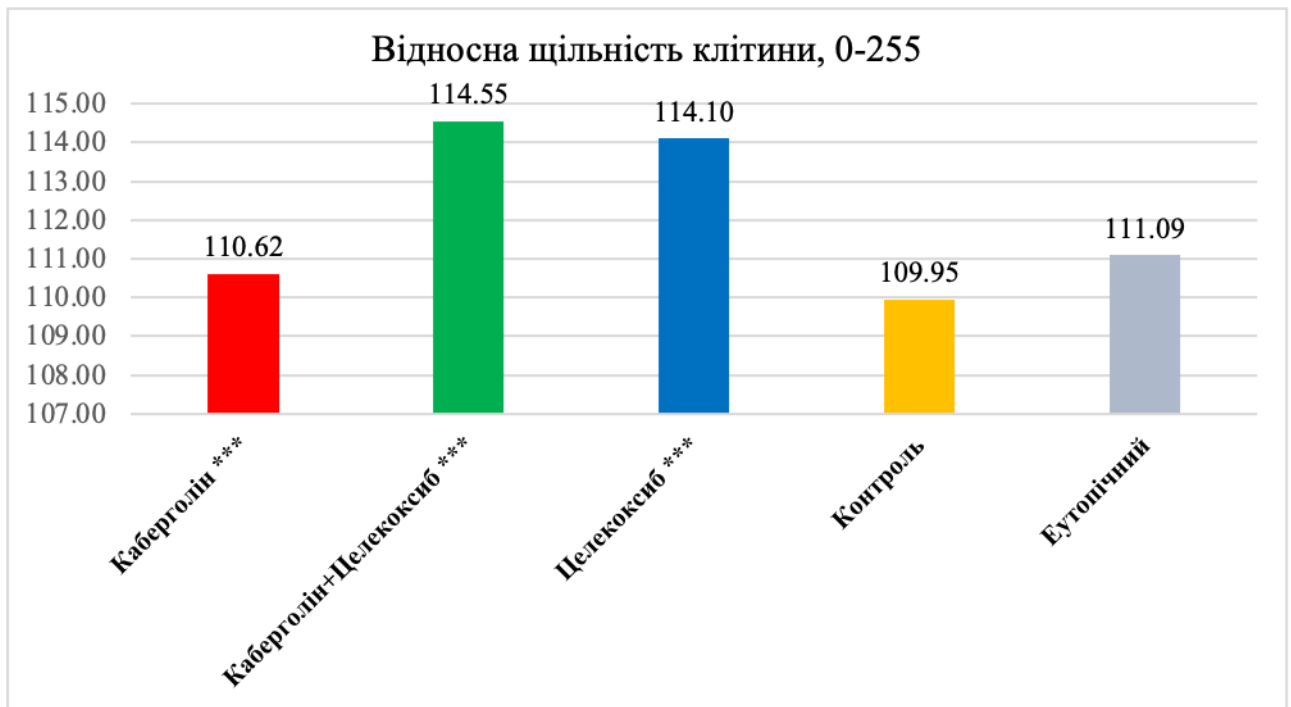


Рисунок 6.9 – Відносна щільність епітеліоцитів, 0-255. \* –  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p > 0,05$

Згідно з теоретичними даними, які наведені в сучасній літературі, інгібітори ЦОГ-2 потенційно мають інгібуючу дію на ангиогенез шляхом деактивації утворення ПГ E2, який, на думку багатьох авторів, відповідає за альтернативний (не-VEGF) шлях ангиогенезу. Проте, як вказують дані нашого дослідження, застосування іСОХ при експериментальному ендометріозі у щурів не дало очікуваної ефективності. Незважаючи на достовірне зменшення уражень у розмірах (хоча й менш значне ніж при використанні СВГ), розміри епітеліоцитів, їхньої секреторної частини залишилися без змін. Також у даній групі переважали ендометріоїдні ураження у вигляді кістозних структур, з яких

майже 1/3 мали темний вміст, що підтверджує їх активність. Вочевидь, блокування не-VEGF шляхів ангиогенезу є недостатнім для пригнічення росту ендометріюїдних уражень у експерименті. Подібне ствердження зустрічається і у публікації Ху та співавт. (2015) [226], де автори не отримали очікуваних результатів при застосування високоселективних інгібіторів ЦОГ-2 щодо пригнічення ангиогенезу у пухлині. Вочевидь, можливу роль та часо-залежений ефект від застосування високоселективних інгібіторів ЦОГ-2 при ендометріозі слід вивчити детальніше.

Комплексне застосування агоніста дофамінових рецепторів (СВГ) та високоселективного інгібітора ЦОГ-2 (іСОХ), аналогічно попередній групі (з використанням іСОХ окремо) не дало очікуваної ефективності, незважаючи на помітну ефективність застосування СВГ окремо. Хоча середній об'єм утворень був достовірно менший, ніж у контрольній групі, розміри епітеліоцитів достовірно не зменшилися порівняно із контролем, а секреторна їх частина навіть більша чим в контролі. Як і при застосуванні іСОХ окремо, при застосуванні СВГ разом із іСОХ спостерігалась вакуолізація епітеліоцитів, про що свідчить збільшений показник відносної щільності клітин. Водночас спостерігалась компактизація ядер епітеліоцитів. Ці дані свідчать про недостатнє пригнічення функціональної активності ендометріальних клітин, а відтак, недостатній регрес ендометріюїдних ектопічних вогнищ.

Незважаючи на теоретично очікувану синергічність дії СВГ та іСОХ, результати нашого дослідження вказують на відсутність такої. Подібні висновки також були зроблені Ху та співавт. (2015) [226]. У зазначеній роботі показали, що бевацізумаб (bevacizumab, прямий, специфічний блокатор VEGF) у поєднанні з іСОХ мають помітно меншу ефективність при блокуванні ангиогенезу пухлин, ніж при окремому застосуванні.

Отже, застосування агоніста дофамінових рецепторів в якості інгібітора VEGF в комплексі з високоселективним інгібітором ЦОГ-2 не призводить до потенціонування чи сумації їх ефектів. В той же час, застосування інгібітора

ЦОГ-2 окремо показало достовірно меншу ефективність, ніж при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів D2 в якості інгібітора VEGF. Виходячи з даних нашого дослідження, застосування агоніста дофамінових рецепторів з метою інгібування ангіонеогенезу при ендометріозі має реальні перспективи для подальшого вивчення, в тому числі на інших тваринних моделях та в клінічних дослідженнях.

Беручи до уваги сучасні погляди на патогенез перитонеального ендометріозу [239, 272, 273] метою клінічних досліджень було визначення ефективного індикатора перитонеального ендометріозу у еутопічному ендометрії для ймовірного використання при неінвазійній діагностиці даної патології. Після первинного наукового пошуку можливими індикаторами були визначені MMP-2, MMP-9 та VEGFR-2 [19, 104, 200, 221, 273].

У дослідженні взяли участь 43 пацієнтки. Віковий склад обстежуваних жінок знаходився в межах від 22 до 48 років.

У комплексі обстеження суб'єктів дослідження, окрім збору анемнестичних даних, загально-клінічних та біохімічних аналізів, також увійшло визначення онкомаркерів СА-125 та HE4. Отримані нами дані щодо онкомаркерів чітко корелюють з даними Oliveira et al. (2017) та Fiala et al. (2018) [260, 261]. Вищезазначені автори дійшли до висновку, що СА-125 може бути корисним для діагностики глибокого ендометріозу, особливо коли периферична кров для аналізу зібрана під час менструації або в першій половині менструального циклу. Що стосується HE4 отримані нами дані не були настільки ж інформативними, як і СА-125 і це корелює з даними Mckinnon et al. (2015) [262] (рис. 6.10).

Забір біологічного матеріалу для гістологічного дослідження проводили під час лапароскопії та під час гістероскопії або кюретажу матки у стерильний пластиковий контейнер згідно стандартних правил забору матеріалу для морфологічних досліджень.



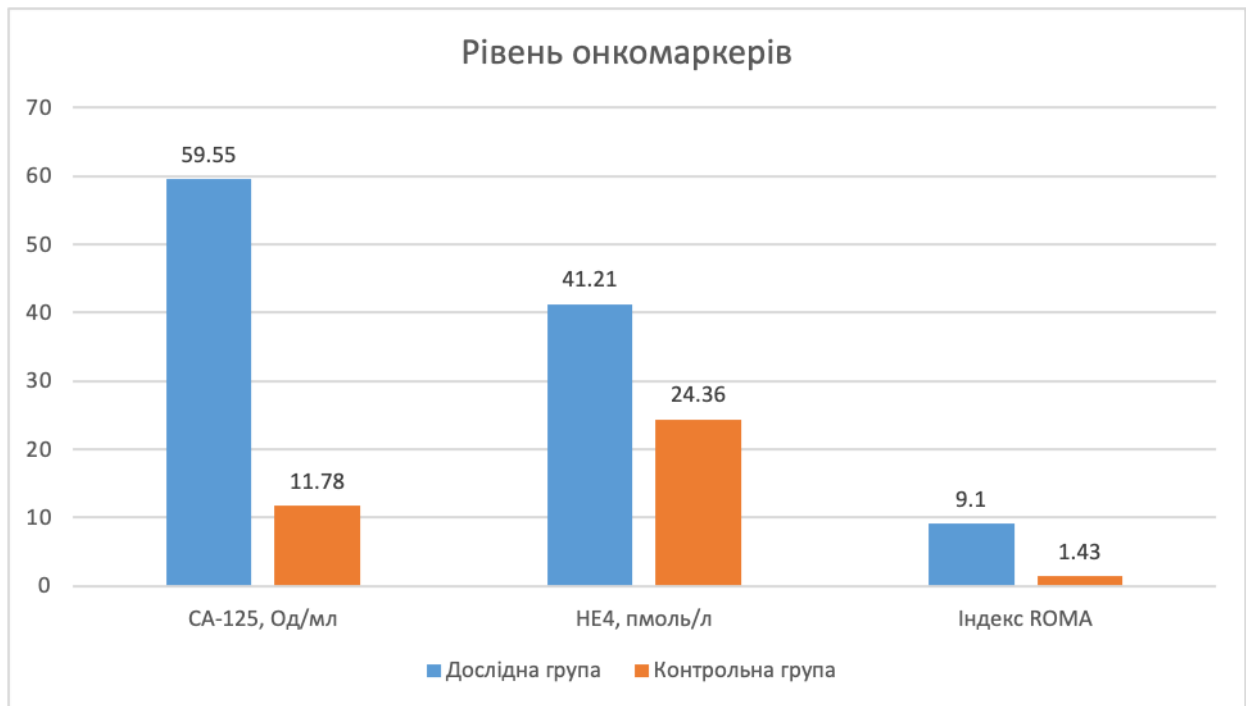


Рисунок 6.10 – Рівень онкомаркерів.  $p < 0,0001$  порівняно з контрольною групою

Матеріал фіксували протягом 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, а після зневоднювання у висхідній батареї етанолу проводили заливку у парафінові блоки, з яких на санному мікроскопі робили гістологічні зрізи (в кількості від 2-х до 5-ти для кожного суб'єкту дослідження) товщиною 5 мкм. Після депарафінізації зрізів з оглядовою метою виконували забарвлення гематоксиліном і еозином, а згодом, після попереднього огляду мікропрепаратів забарвлених гематоксиліном та еозином для кожного суб'єкту дослідження виконували однотипні зрізи на санному мікроскопі, після чого виконували імуногістохімічне дослідження згідно протоколу виробника (Abcam).

З метою об'єктивізації даних імуногістологічного дослідження нами був розрахований показник оптичної щільності імуногістохімічних зображень (оптична щільність ІГХ) [247].

Нами були отримані наступні дані оптичної щільності ІГХ (рис. 6.11): як щодо MMP-2, так й щодо MMP-9 спостерігалася достовірна різниця між рівнем експресії у еутопічному ендометрії контрольної групи та еутопічним ендометрієм дослідної групи. Що стосується ектопічного та еутопічного ендометрія у дослідній групі, то між ними не виявлено достовірної різниці.

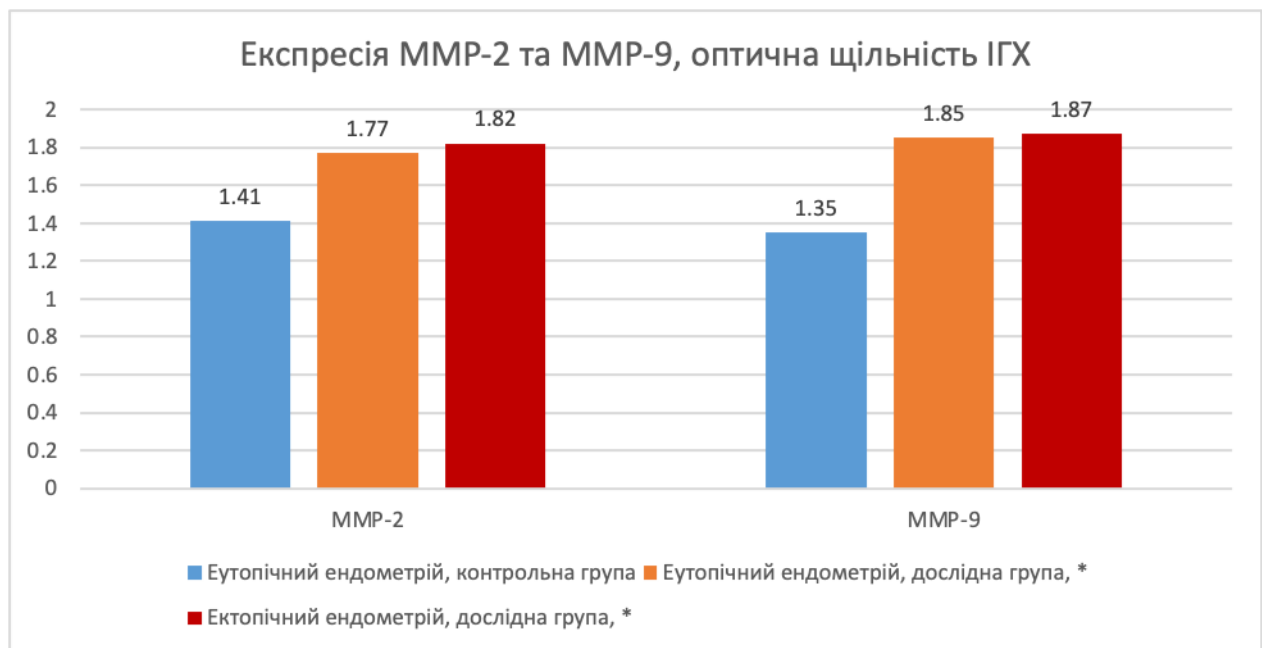


Рисунок 6.11 – Експресія MMP-2 та MMP-9 в еутопічному ендометрії контрольної групи та еутопічному й ектопічному ендометрії дослідної групи.

\*  $p < 0,0001$  порівняно з контрольною групою

Нами був визначений кореляційний коефіцієнт Пірсона для ектопічного та еутопічного ендометрія внаслідок чого виявлена сильна кореляція (MMP-2 – 0,7401, при  $p < 0,001$ ; MMP-9 – 0,887; при  $p < 0,001$ ) між рівнем експресії MMP-2 та MMP-9 у вказаних тканинах, що свідчить про можливість використання експресії деяких металопротеїназ у еутопічному ендометрії для неінвазійної діагностики ендометріозу. Подібні висновки стосовно рівня матричних металопротеїназ у сироватці та перитонеальній рідині були зроблені Liu H., Tanbo та співавт. (2016) [19]. Можливу роль MMP-2 при ендометріозі та рівні

даної металопротеїнази у сироватці крові в перитонеальній були вивчені Sui X., Li Y. та співавт. (2018) [273].

Зважаючи на встановлену важливу роль VEGF та реципрокну активацію VEGF та MMP-9 при пухлинних захворюваннях, зокрема при гепатоцелюлярній карциномі [221] нами було прийнято рішення вивчити експресію рецептора VEGFR-2, як одного з найбільш неспецифічного рецептора.

Експресія VEGFR-2, як металопротеїназ, була визначена у еутопічному ендометрії контрольної та дослідної груп та у ектопічному ендометрії дослідної груп. При визначенні експресії рецепторів VEGFR-2 до VEGF у ектопічному ендометрії дослідної групи виявили поодинокі групи позитивних клітин, які розташувалися в стінках судин або в перивазальній мезенхімі. Однак, в еутопічному ендометрії, як дослідної, так і контрольної групи лише для декількох суб'єктів дослідження були виявлені поодинокі (1-2) позитивні клітини. Зважаючи на це, для об'єктивізації даних імуногістохімії ми проводили ручний підрахунок позитивно зафарбованих клітин у імуногістохімічному препараті. Отримали наступні дані (рис. 6.12):

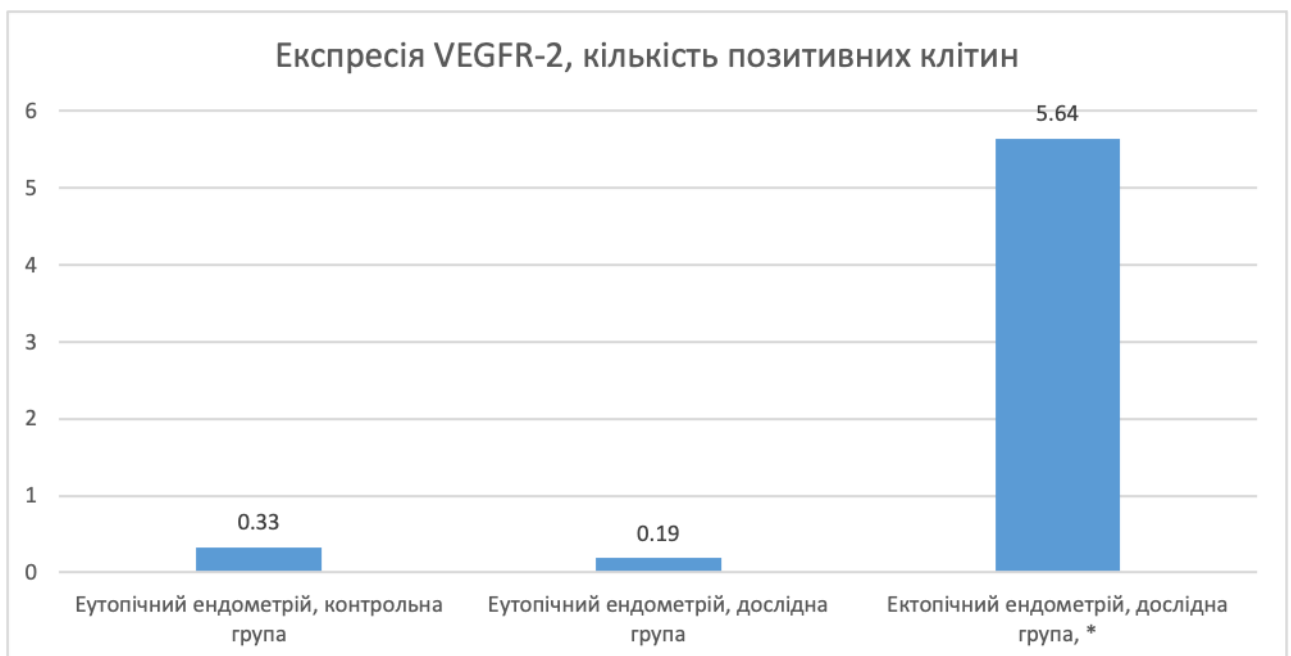


Рисунок 6.12 – Експресія VEGFR-2 в еутопічному ендометрії контрольної групи та еутопічному й ектопічному ендометрії дослідної групи. \*  $p < 0,0001$  порівняно з контрольною групою

Отримані нами дані експресії VEGFR-2 свідчать про високу активність VEGF в ектопічних вогнищах, проте активність у еутопічному ендометрії в дослідній групі недостовірно відрізнявся від контрольної групи. Даний факт корелює із твердженнями Young VJ, Ahmad SF та співавт. (2015) [269] та Bourlev V, Volkov N та співавт. (2006) [63], що VEGF синтезується переважно макрофагами, які мігрують у місце інвазії базальної мембрани, а VEGFR-2 рецептори, які знаходяться у дендритних клітинах активуються та призводять до запуску каскаду неоангіогенезу.

До отриманих клініко-лабораторних та гістологічних результатів застосували алгоритм логістичної регресії за методом “Enter”, який полягає у тому, що всі вхідні параметри для моделювання вносяться одночасно. В отриманій логістичній регресійній моделі немає окремого детермінуючого параметра ( $p$  дорівнює більше 0,05 у всіх випадках), проте домінуючими параметрами, які прямо пропорційно впливають на вірогідність наявності ендометріозу є підвищений рівень СА-125, підвищена експресія MMP-2 та, зокрема, підвищена експресія MMP-9. Зворотно пропорційно впливають (чим більше, тим менша ймовірність наявності ендометріозу) такі параметри як кількість вагітностей та вік. Отримані коефіцієнти регресії чітко корелюють з відношенням шансів для перерахованих вхідних параметрів. Площа під ROC-кривою (AUROC)  $> 0,9$  свідчить про хорошу точність тесту. Специфічність дорівнює 92,77, чутливість – 90,67.

Виходячи з отриманих клініко-лабораторних, імуногістохімічних даних та отриманої регресивної моделі, створення предиктивної моделі на основі технологій машинного навчання (machine learning, ML) засобами мови програмування Python, як стверджують Holloway J, Neely C, Yuan X та співавт. (2020) [274] є одним з перспективних напрямків розвитку ранньої та своєчасної неінвазійної діагностики з визначенням відношення ризику перитонеального ендометріозу.

## ВИСНОВКИ

Ендометріоз діагностують у 5-10 % жіночої популяції. Пізнє виявлення, ненадто висока ефективність існуючих методів лікування, значний відсоток рецидивів захворювання після припинення застосування лікарських засобів, а також висока частота виникнення побічних дій при проведенні медикаментозної терапії роблять актуальним пошук нових вирішень питань ранньої діагностики, прогнозування та оптимізації лікування при перитонеальному ендометріозі.

1. Ендометріодні гетеротопії у статевозрілих самок білих щурів з експериментально індукованим зовнішнім генітальним ендометріозом, представлені кістозними гетеротопіями, заповненими темною або світлою рідиною. В них порівняно з еутопічним ендометрієм інтактних тварин вірогідно збільшена висота епітеліоцитів ( $(50,01 \pm 10,69)$  мкм проти  $(28,38 \pm 6,65)$  мкм) та висота їх секреторного полюсу ( $(16,30 \pm 5,57)$  мкм проти  $(11,88 \pm 3,2)$  мкм) на тлі відсутності відмінностей у розмірах, відносної щільності ядра і відносної щільності клітин. Ендометріодні гетеротопії характеризуються підвищеною експресією рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту у вигляді поодиноких скупчень імунопозитивних клітин в ділянках новоутворених капілярів, в їх просвіті або в місцях майбутнього розвитку капілярів; матричної металопротеїнази-2 – в епітелії, субепітеліальних ділянках, в цитогенній стромі й навколо судин; матричної металопротеїнази-9 – переважно в епітелії та в цитогенній стромі.

2. Агоніст дофамінових рецепторів є високоактивним інгібітором ектопічного ендометрія: під його впливом при індукованому перитонеальному ендометріозі у статевозрілих самок білих щурів пригнічується функціональна та секреторна активність ендометріодних гетеротопій зі зменшенням висоти епітеліоцитів та їх секреторного полюсу, знижуються процеси трансляції та синтезу білків, про що свідчить збільшення щільності ядра при одночасному

зменшенні його розмірів, знижується літична дія на сполучнотканинний матрикс за рахунок вірогідних змін експресії матричної металопротеїнази-2 ((1,72 ± 0,27) ум.од. проти (2,08 ± 0,31) ум.од.), матричної металопротеїнази-9 ((1,88 ± 0,20) ум.од. проти (2,19 ± 0,31) ум.од.), пригнічення ангиогенезу – майже відсутні імунопозитивні клітини до рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту ((0,11 ± 0,32) проти (9,79 ± 3,29) ум.од.). Застосування агоніста дофамінових рецепторів в якості інгібітора рецепторів 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в комбінації з високоселективним інгібітором циклооксигенази-2 не призводить до потенціювання чи сумачії їх ефектів.

3. Експресія матричних металопротеїназ-2 і -9 в еутопічному ендометрії ((1,77 ± 0,22) ум.од. (p < 0,01) і (1,85 ± 0,26) ум. од. (p < 0,01)) і в ендометріюїдних гетеротопіях на очеревині ((1,82 ± 0,27) ум.од. (p < 0,01) і (1,87 ± 0,30) ум. од. (p < 0,01)) жінок з перитонеальним ендометріозом є вищою, ніж в еутопічному ендометрії жінок без ендометріозу ((1,41 ± 0,34) ум.од і (1,35 ± 0,07) ум. од. (p < 0,01)), що може сприяти деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу, а також інвазії ендометріюїдної тканини в підлеглу тканину міометрію та очеревини.

4. Експресія рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в еутопічному ендометрії жінок з ((0,19 ± 0,07) ум.од.) та без перитонеального ендометріозу ((0,33 ± 0,18) ум. од.) статистично значимо не відрізняється. Оптична щільність імунопозитивних клітин до рецептору 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту в ендометріюїдних гетеротопіях ((5,64 ± 4,41) ум.од.) перевищує аналогічну в еутопічному ендометрії жінок з та без перитонеального ендометріозу відповідно в 29,68 (p < 0,01) і в 17,09 (p < 0,01) раз. Отримані результати, з урахуванням даних літератури, підтверджують гіпотезу щодо перитонеального походження рецепторів 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту (макрофаги та дендритні клітини), тому його експресія в ектопічному ендометрії не корелює з аналогічною в

еутопічному ендометрії жінок з перитонеальним ендометріозом. Активація рецепторів 2 типу судинно-ендотеліального фактору росту відбувається *ad hoc* у ендотеліальних клітинах, які мігрують в місце асептичного запалення в очеревині з метою неоангіогенезу.

5. Встановлена пряма кореляція при перитонеальному ендометріозі між експресією в еутопічному та ектопічному ендометрії матричної металопротеїнази -2 ( $r=0,74$ ,  $p < 0,01$ ) і матричної металопротеїнази -9 ( $r=0,88$ ,  $p < 0,01$ ). Це вказує на те, що імуногістохімічне визначення експресії матричних металопротеїназ-2 і -9 в еутопічному ендометрії має діагностичне та прогностичне значення і може використовуватися для раннього виявлення перитонеального ендометріозу.

6. При регресійному аналізі визначено, що домінуючими параметрами, які прямо пропорційно впливають на вірогідність наявності перитонеального ендометріозу є підвищений рівень в крові СА-125 (коефіцієнт регресії 0,107), підвищена експресія в еутопічному ендометрії матричної металопротеїнази -2 (0,52) та матричної металопротеїнази-9 (1,92), зворотно пропорційно впливають такі параметри як кількість вагітностей (-0,915) та вік хворої (-0,118). На основі проведеного логістичного регресійного аналізу отримано значення прогнозованої ймовірності (від 0 до 1), які є синтетичними показниками. Отримані значення прогнозованої ймовірності AUROC (площа під ROC-кривою) складають 0,926, чутливості – 92,7 та специфічності – 90,67, що дозволяє використовувати запропоновану регресійну модель, як основу для комплексного діагностичного критерію ранньої діагностики перитонеального ендометріозу.

Агоніст дофамінових рецепторів, високоселективний інгібітор циклооксигенази-2 та їх сполучення є високоактивними інгібіторами ектопічного ендометрія: під їх впливом при індукованому зовнішньому генітальному ендометріозі у статевозрілих самок білих щурів пригнічується функціональна та секреторна активність ендометріюїдних гетеротопій зі

зменшенням висоти епітеліоцитів та їх секреторного полюсу, знижуються процеси трансляції та синтезу білків, про що свідчить збільшення щільності ядра при одночасному зменшенні його розмірів, знижується літична дія на сполучнотканинний матрикс за рахунок змін експресії матричної металопротеїнази-2 ((1,72 ± 0,27) ум.од. (p < 0,01), (2,29 ± 0,18) ум.од. (p > 0,05), (1,62 ± 0,18) ум.од. (p < 0,01) проти (2,08 ± 0,31) ум.од.), матричної металопротеїнази-9 ((1,88 ± 0,20) ум.од. (p < 0,01), (2,49 ± 0,26) ум.од. (p < 0,03), (1,60 ± 0,23) ум.од. (p < 0,01) проти (2,19 ± 0,31) ум.од.), пригнічення ангиогенезу – майже відсутні імунопозитивні клітини до рецептора 2 типу судинно-ендотеліального фактора росту ((0,11 ± 0,32) ум.од. (p < 0,01), (0,26 ± 0,45) ум.од. (p < 0,01), (0,15 ± 0,37) ум.од. (p < 0,01) проти (9,79 ± 3,29) ум.од.).



## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

З метою ранньої неінвазивної діагностики зовнішнього ендометріозу у жінок репродуктивного віку з хронічним тазовим болем та/або диспареунією та/або безпліддям рекомендується виконувати наступне обстеження:

1. Визначення СА-125 у венозній крові.
2. Забір еутопічного ендометрія шляхом аспіраційної біопсії на 9-12 день менструального циклу з наступним визначенням рівня матричних металопротеїназ (ММР-2 та ММР-9) за допомогою імуногістохімії (первинні антитіла до ММР-2 та ММР-9, система детекції HRP/DAB).
3. За допомогою розробленої логістичної регресійної моделі із застосуванням комп'ютерної програми необхідно розрахувати діагностичний ризик зовнішнього ендометріозу використовуючи показники СА-125 та показники імуногістохімічної експресії ММР-2 та ММР-9.

## ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Представлені результати дослідження патогенетичного лікування (за допомогою агоніста дофамінових рецепторів та високоселективного інгібітора ЦОГ-2) зовнішнього ендометріозу на основі експериментальної моделі на щурах є початковою сходинкою до вивчення клінічної ефективності запропонованого лікування.

Створення предиктивної моделі на основі технологій машинного навчання (machine learning, ML) засобами мови програмування Python є одним з перспективних напрямків розвитку ранньої та своєчасної неінвазивної діагностики з визначенням відношення ризику перитонеального ендометріозу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh SS. Endometriosis: diagnosis and management, SOGC Clinical and practical guideline. 2010;7(32):1-28.
2. Dunselman G, 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;29:400-12.
3. Missmer S, Hankonson S, Spiegelman D, Barbieri R, Marshall L, Hunter D. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors Am J Epidemiol. 2004(160):784–96.
4. Falcone T, Flyckt R. Clinical Management of Endometriosis. Obstet Gynecol. 2018;3(131):557-71.
5. Buck Louis G, Hediger M, Peterson M, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, et al. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. 2011(96):360–5.
6. Guideline on the management of women with endometriosis. ESHRE: ESHRE; 2013.
7. Бойчук А, Курило О, Хлібовська О. Вплив ендометріозу у поєднанні з порушеннями функції щитоподібної залози на психоемоційний стан жінок. Одеський медичний журнал. 2018;2:60-2.
8. Holland T, Cutner A, Saridogan E, Mavrellos D, Pateman K, Jurkovic D. Ultrasound mapping of pelvic endometriosis: does the location and number of lesions affect the diagnostic accuracy? A multicentre diagnostic accuracy study. BMC Womens Health. 1993(13):43.
9. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Human Reproduction. 2005;20(10):2698-704.

10. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera J, Ruiz-Sauri A, Garcia-Valsce JA. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Human Reproduction*. 2009;24(5):1025-35.
11. Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baranao R, Meresman G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2011;96(2):428-33.
12. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and Infertility: A review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2012;39(4):535-49.
13. Адамян Л, Андреева Е, Аполихина И, Беженарь В. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Москва: Медицина; 2013.
14. Дубровиной СО, Беженаря ВФ. Эндометриоз. Патогенез, диагностика, лечение Москва: ГЭОТАР-МЕД; 2020.
15. Burney R, Giudice L. Endometriosis: pathogenesis and pathophysiology. *Fertil Steril*. 2012;3(98):511-9.
16. Patel B, Lenk E, Lebovic D, Shu Y, Yu J, Taylor R. Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018(50):50-60.
17. Rolla E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*. 2019(8)
18. Bruner-Tran K, Herington J, Duleba A, Taylor H, Osteen K. Medical management of endometriosis: emerging evidence linking inflammation to disease pathophysiology. *Ann NY Acad Sci*. 2013;2(65):199-213.
19. Liu H, Wang J, Wang H, Tang N, Li Y. The plasma and peritoneal fluid levels of MMP-9 are elevated in patients with endometriosis. *Ann Clin Biochem*. 2016

20. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017;6(96):659-67.
21. Адамьян ЛВ, Гаспарян СА. Генитальный эндометриоз. Современный взгляд на проблему. СГМА. Ставрополь, 2004.
22. Parazzini F, Esposito G, Tozzi L, Noli S, Bianchi S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017(209):3-7.
23. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction.* 2014;29(3):400-12.
24. Kettel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 1951;61(2):440-2.
25. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 1927;14:422-69.
26. Tal A, Tal R, Pluchino N, Taylor H. Endometrial cells contribute to preexisting endometriosis lesions in a mouse model of retrograde menstruation. *Biol Reprod.* 2019;6(100):1453-60.
27. Jiang L, Yan Y, Liu Z, Wang Y. Inflammation and endometriosis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2016(21):941-8.
28. Barbieri RL. Stenosis of the external cervical os: an association with endometriosis in women with chronic pelvic pain. *Fertility and Sterility.* 1998;70(3):571-3.
29. Freytag D, Mettler L, Maass N, Günther V, Alkatout I. Uterine anomalies and endometriosis. *Minerva Med.* 2020;1(111):33-49.
30. Warren L, Shih A, Renteira S, Seckin T, Blau B. Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. *Mol Med.* 2018;1(24):635-8.

31. Kyama C, Falconer H, Cuneo S, Chai D, Mihalyi A. Menstrual endometrial supernatant may induce stromal endometriosis in baboons. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2014(6):16-28.
32. Overton C, Davis C, McMillan L, Shaw RW, Koh C. *An Atlas of Endometriosis*. Healthcare I, editor: CRC Press; 2013.
33. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1127:106-15.
34. Burney RO, Guidice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2012;98(3):511-9.
35. Hapangama D, Drury J, Da Silva L, Al-Lamee H, Earp A, Valentijn A. Abnormally located SSEA1+/SOX9+ endometrial epithelial cells with a basalis-like phenotype in the eutopic functionalis layer may play a role in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction*. 2019;1(34):56-68.
36. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. 2007;25(8):2082-6.
37. Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 1995;64(2):340-6.
38. Bulun SE, Cheng YH, Yin P. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006;248(1-2):94-103.
39. Zubrzycka A, Zubrzycki M, Perdas E, Zubrzycka M. Genetic, Epigenetic, and Steroidogenic Modulation Mechanisms in Endometriosis. *J Clin Med*. 2020;5(9):1309.
40. Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. *Curr Med Chem*. 2011;2(18):200-8.
41. Fan H. In-vitro models of human endometriosis. *Exp Ther Med*. 2020;3(19):1617-25.

42. Maeda N, Izumiya C, Taniguchi K, Matsushima S, Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012(4):1568-81.
43. Gilabert-Estelles J, Estelles A, Gilabert J, Castello R, Espana F, Falco C. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Human Reproduction*. 2003;18:1516-22.
44. May KE, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Human Reproduction Update*. 2011;17(5):637-53.
45. Braza-Boïls A, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Fertility and Sterility*. 2014;5(29):978-88.
46. Bulun SE. Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360:268-79.
47. Hapangama D, Raju R, Valentijn A, Barraclough D, Hart A, Turner M, et al. Aberrant expression of metastasis-inducing proteins in ectopic and matched eutopic endometrium of women with endometriosis: implications for the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod*. 2021;2(27):394-407.
48. Noble LS, Takayama K, Zeitoun K. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(2):600-6.
49. Yamanaka K, Xu B, Suganuma I, Kusuki I, Mita S, Shimizu Y, et al. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. *Fertil Steril*. 2012;2(97):477-82.
50. Marquardt RM, Kim T, Shin J-H, Jeong J-W. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *Int J Mol Sci*. 2019;15(20):3822.

51. Surrey ES. The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2006;13(6):528-34.
52. Abushahin F, Goldman KN, Barbieri E, Milad M, Rademaker A, Bulun SE. Aromatase inhibition for refractory endometriosis-related chronic pelvic pain. *Fertility and Sterility*. 2011;96(4):939-42.
53. Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(41):39261-4.
54. Bedaiwy M, Dahoud W, Skomorovska-Prokvolit Y, Yi L, Liu J, Falcone T, et al. Abundance and Localization of Progesterone Receptor Isoforms in Endometrium in Women With and Without Endometriosis and in Peritoneal and Ovarian Endometriotic Implants. *Reprod Sci*. 2015;9(22):1153-61.
55. Cheng YH, Imir A, Fenkci V, Yilmaz MB, Bulun SE. Stromal cells of endometriosis fail to produce paracrine factors that induce epithelial 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and its transcriptional regulator Sp1: a mechanism for defective estradiol metabolism. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2007;196(4):391.
56. Viallard C, Larrivéé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;4(20):409-26.
57. Sobocińska A, Czarnecka A, Szczylik C. Mechanisms of angiogenesis in neoplasia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016(70):1166-81.
58. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(10):795-803.
59. Samimi M, Pourhanifeh M, Mehdizadehkashi A, Eftekhar T, Asemi Z. The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression. *J Cell Physiol*. 2019;11(234):19384-92.
60. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for

angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81(8):3112-8.

61. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews*. 2004;56(4):549-80.

62. Sharkey AM, Day K, McPherson A. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000;85(1):402-9.

63. Filip L, Duică F, Prădatu A, Crețoiu D, Suciuc N, Crețoiu S, et al. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches. *Medicina (Kaunas)*. 1996;9(56):460.

64. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. 2006;132(3):501-9.

65. Rashidi B, Sarhangi N, Aminimoghaddam S, Haghollahi F, Naji T, Amoli M, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) Gene polymorphisms and expression with the risk of endometriosis: a case-control study. *Human Reproduction*. 2019;3(46):3445-50.

66. Hogg C, W Horne A, Greaves E. Endometriosis-Associated Macrophages: Origin, Phenotype, and Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020(1):7.

67. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammanacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development*. 2001;100(2):157-63.

68. Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.

69. Lee J, Hong S-H. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *Int J Stem Cells*. 2020;1(13):1-12.



70. Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T. Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(4):1782-91.
71. Virani S, Edwards AK, Thomas R, Childs T, Tayade C. Blocking of stromal cell-derived factor-1 reduces neoangiogenesis in human endometriosis lesions in a mouse model. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70(5):386-97.
72. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006;147(3):1278-86.
73. Edwards A, Nakamura D, Virani S, Wessels J, Tayade C. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2013;1(97):85-94.
74. Stanic AK, Kim M, Styer AK, Rueda BR. Dendritic cells attenuate the early establishment of endometriosis-like lesions in a murine model. *Reproductive Sciences*. 2014;21:1228-36.
75. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction*. 2005;20:2698-704.
76. Schliep K, Mumford S, Peterson C, Chen Z, Johnstone E, Sharp H. Pain typology and incident endometriosis. *Hum Reprod*. 1993;10(30):2427-38.
77. Lemaire GS. More than just menstrual cramps: symptoms and uncertainty among women with endometriosis. *Journal of Obstetrics and Gynecology and Neonatal Nursening*. 2004;33:71-9.
78. Bourdel N, Chauvet P, Billone V, Douridas G, Fauconnier A, Gerbaud L, et al. Systematic review of quality of life measures in patients with endometriosis. *PLoS One*. 2019;1(14):e0208464.

79. Luscombe GM, Markham R, Judio M, Grigoriu A, Fraser IS. Abdominal bloating: an under-recognized endometriosis symptom. *Journal of Obstetrics and Gynecology of Canada*. 2009;31:1159-71.
80. Bellelis P, Dias JA, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC, Abrao MS. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis-a case series. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010;56:467-71.
81. Boychuk A, Nikitina I. Estimation of relative risk of development and informativeness of diagnostic methods of hyperproliferative processes of endometrium. *Wiadomosci lekarskie*. 2020;2(73):2004–9.
82. Ballard KD, Seaman HE, de Vries CS, Wright JT. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study. *BJOG*. 2008;115:1382-91.
83. Guzick D, Huang L-S, Broadman B, Nealon M, Hornstein M. Randomized trial of leuprolide versus continuous oral contraceptives in the treatment of endometriosis-associated pelvic pain. *Fertil Steril*. 2011;5(95):1568-73.
84. Jenkins TR, Liu CY, White J. Does response to hormonal therapy predict presence or absence of endometriosis? *Journal of Minimum Invasive Gynecology*. 2008;15:82-6.
85. Muzii L, Di Tucci C, Achilli C, Di Donato V, Musella A, Palaia I, et al. Continuous versus cyclic oral contraceptives after laparoscopic excision of ovarian endometriomas: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;2(214):203-11.
86. Brown J, Pan A, Hart RJ. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Systematic Review*. 2010
87. Zorbas K, Economopoulos K, NF V. Continuous versus cyclic oral contraceptives for the treatment of endometriosis: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;1(292):37-43.

88. Vercellini P, Barbara G, Somigliana E, Bianchi S, Abbiati A, Fedele L. Comparison of contraceptive ring and patch for the treatment of symptomatic endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2010;93:2150-61.
89. Brown J, Kives S, Akhtar M. Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Systematic Review*. 2012
90. Ferrero S, Barra F, Maggiore U. Current and Emerging Therapeutics for the Management of Endometriosis. *Human Reproduction*. 2018;10(78):995-1012.
91. Tamai H, Kinugasa M, Nishio M, Miyake M. Peritoneal inclusion cysts treated with a levonorgestrel-releasing intrauterine system: A case report. *Case Rep Womens Health*. 2019(22):e00113.
92. Ferreira RA, Vieira CS, Rosa ES, Nogueira AA. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cardiovascular risk markers in patients with endometriosis: a comparative study with the GnRH analogue. *Contraception*. 2010;81:117-22.
93. Radzinsky V, Khamoshina M, Nosenko O, Lebedeva M, Orazov M. Treatment strategies for pelvic pain associated with adenomyosis. *Gynecological Endocrinology*. 2016(32):19-22.
94. Makarainen L, Ronnberg L, Kauppila A. Medroxyprogesterone acetate supplementation diminishes the hypoestrogenic side effects of gonadotropin-releasing hormone agonist without changing its efficacy in endometriosis. *Fertility and Sterility*. 1996;65:29-34.
95. Brown J, Pan A, Hart R. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(12):CD008475.
96. Chen J, Gao H, Li Q, Cong J, Wu J, Pu D, et al. Efficacy and safety of remifemin on peri-menopausal symptoms induced by post-operative GnRH-a therapy for endometriosis: a randomized study versus tibolone. *Med Sci Monit*. 2014(20):1950-7.

97. Becker C, Gattrell W, Gude K, Singh S. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril*. 2017;1(108):125-36.
98. Nawathe A, Patwardhan S, Yates D, Harrison GR, Khan KS. Systematic review of the effects of aromatase inhibitors on pain associated with endometriosis. *BJOG*. 2008;115:818-22.
99. Ferrero S, Gillott DJ, Venturini PL, Remorgida V. Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. *Reproductive Biology Endocrinology*. 2011;9:89.
100. Sher C, Haudenschild C, Rlagsbrun M. The chick chorioallantoic membrane as a model system for the study of tissue invasion by viral transformed cells. *Cell*. 1976;8:373-82.
101. Swadi R, Mather G, Pizer B, Losty P, See V, Moss D. Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery. *BMC Cancer*. 2018;1(18):28.
102. Pluchino N, Poppi G, Yart L, Marci R, Wenger J-M, Tille J-C, et al. Effect of local aromatase inhibition in endometriosis using a new chick embryo chorioallantoic membrane model. *J Cell Mol Med*. 2019;8(23):5808-12.
103. Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Human Reproduction*. 2002;16:627-31.
104. Juhasz-Böss I, Hofele A, Lattrich C, Buchholz S, Ortmann O, Malik E. Matrix metalloproteinase messenger RNA expression in human endometriosis grafts cultured on a chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril*. 2010;1(94):40-5.
105. Jeung I, Cheon K, Kim M-R. Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2016(2016)

106. Mangir N, Raza A, Haycock J, Chapple C, Macneil S. An Improved In Vivo Methodology to Visualise Tumour Induced Changes in Vasculature Using the Chick Chorionic Allantoic Membrane Assay. *In Vivo*. 2018;3(32):461-72.
107. Wolber EM, Kressin P, Meyhofer-Malik A, Diedrich K, Malik E. Differential induction of matrix metalloproteinase 1 and 2 in ectopic endometrium. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;6:238-43.
108. Golan A, Winston RM, Dragenio R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. *Israel Journal of Medical Sciences*. 1984;20:1094-6.
109. Lobo V, Soares Jr J, Simões M, Simões R, de Lima G, Baracat E. Does gestrinone antagonize the effects of estrogen on endometrial implants upon the peritoneum of rats? *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;4(63):525-30.
110. Escudero-Lara A, Cabañero D, Maldonado R. Surgical Induction of Endometriosis in Female Mice. *Bio Protoc*. 2020;18(10):e3763.
111. Rajkumar K, Schott PW, Simpson CW. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertility and Sterility*. 1990;53:921-5.
112. Stilley J, Woods-Marshall R, Sutovsky M, Sutovsky P, Sharpe-Timms K. Reduced fecundity in female rats with surgically induced endometriosis and in their daughters: a potential role for tissue inhibitors of metalloproteinase 1. *Biol Reprod*. 2009;4(80):649-56.
113. Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update*. 2006;5(12):641-9.
114. Somigliana E, Vigano P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P. Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Human Reproduction*. 1999;14:2944-50.

115. Knudtson J, Tekmal R, Santos M, Binkley P, Krishnegowda N, Valente P, et al. Impaired Development of Early Endometriotic Lesions in CD44 Knockout Mice. *Reprod Sci.* 2016;1(23):87-91.
116. Assaf B, Miller A. Pleural endometriosis in an aged rhesus macaque (*Macaca mulatta*): a histopathologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol.* 2012;4(49):636-41.
117. King C, Barbara C, Prentice A, D Brenton J, Charnock-Jones D. Models of endometriosis and their utility in studying progression to ovarian clear cell carcinoma. *J Pathol.* 2016;2(238):185-96.
118. Dunselman GA, Willebrand D, Land JA, Bouckaert PX, Evers JL. A rabbit model of endometriosis. *Gynecology and Obstetrics Investigations.* 1989;27:29-33.
119. Himm RJ, Garza DE, Mathur S, Austin M, Baggett B, Williamson HO. Immunological aspects of surgically induced experimental endometriosis: variation in response to therapy. *Fertility and Sterility.* 1989;52:132-9.
120. Rock JA, Prendergast RA, Bobbie D, Green WR, Parmley TH, Dubin NH. Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis. *Fertility and Sterility.* 1993;59:232-5.
121. Fischer O, Kaufmann-Reiche U, Moeller C, Fuhrmann U. Effects of dienogest on surgically induced endometriosis in rats after repeated oral administration. *Gynecol Obstet Invest.* 2011;3(72):145-51.
122. Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, et al. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Human Reproduction.* 2005;20:2092-6.
123. Yao Z, Shen X, Capodanno I, Donnelly M, Fenyk-Melody J, Hausmann J. Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *Journal of Investigative Surgery.* 2005;18:177-83.

124. Králíčková M, Vetvicka V. Endometriosis and ovarian cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(5):800-5.
125. Cezar T, Schweppe K, Pletzer K, Becker S, Krentel H, Torres-De La Roche L, et al. The cost-effective, but forgotten, medical endometriosis therapy: a prospective, quasi-randomized study on progestin therapy. *Facts Views Vis Obgyn*. 2018;4(10):181-90.
126. Shor E, Baracat EC, Simoes MJ. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*. 1999;26:158-61.
127. Bruner-Tran K, Mokshagundam S, Herington J, Ding T, Osteen K. Rodent Models of Experimental Endometriosis: Identifying Mechanisms of Disease and Therapeutic Targets. *Fertility and Sterility*. 2018;2(14):173-88.
128. Nothnick W. The emerging use of aromatase inhibitors for endometriosis treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011(9):87.
129. Saito T, Yoshizawa M, Yamauchi Y, Kinoshita S, Fujii T, Mieda M, et al. Effects of the novel orally active antiestrogen TZE-5323 on experimental endometriosis. *Arzneimittelforschung*. 2003;53:507-14.
130. Tamay A, Guvenal T, Micili S, Yildirim Y, Ozogul C, Koyuncu F, et al. Evaluation of the effects of gonadotropin-releasing hormone antagonist (GnRH-ant) and agonist (GnRH-a) in the prevention of postoperative adhesion formation in a rat model with immunohistochemical analysis. *Fertility and Sterility*. 2011;5(96):1230-3.
131. Vilos G, Marks-Adams J, Vilos A, Oraif A, Abu-Rafea B, Casper R. Medical treatment of ureteral obstruction associated with ovarian remnants and/or endometriosis: report of three cases and review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol*. 2015;3(22):462-8.
132. Yano S, Ikegami Y, Nakao K. Studies on the effect of the new non-steroidal aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in an endometriosis model in rats. *Arzneimittelforschung*. 1996;46:192-5.

133. Uchiide I, Ihara T, Sugamata M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model. *Fertility and Sterility*. 2002;78:782-6.
134. Ingelmo J, Quereda F, Acien P. Effect of human interferon-alpha-2b on experimental endometriosis in rats: comparison between short and long series of treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;2(167):190-3.
135. Mosher A, Tsoulis M, J Lim J, Tan C, Agarwal S, Leyland N, et al. Melatonin activity and receptor expression in endometrial tissue and endometriosis. *Hum Reprod*. 2019;7(34):1215-24.
136. Bruner-Tran K, Gnecco J, Ding T, Glore D, Pensabene V, Osteen K. Exposure to the environmental endocrine disruptor TCDD and human reproductive dysfunction: Translating lessons from murine models. *Reprod Toxicol*. 2017(68):59-71.
137. Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer SA, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nature medicine*. 2005;11:63-70.
138. Yachida N, Yoshihara K, Yamaguchi M, Suda K, Tamura R, Enomoto T. How Does Endometriosis Lead to Ovarian Cancer? The Molecular Mechanism of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer Development. *Cancers (Basel)*. 2020;6(13):1439.
139. Farahani M, Shahbazi S, Moghaddam S, Mahdian R. Evaluation of KRAS Gene Expression and LCS6 Variant in Genomic and Cell-Free DNA of Iranian Women With Endometriosis. *Reprod Sci*. 2015(6):679-84.
140. Grechukhina O, Petracco R, Popkhadze S, Massasa E, Paranjape T, Chan E, et al. A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis. *EMBO Mol Med*. 2012;37:188-92.
141. Lee D, Kim S, Lee J, Jee B. Management of endometriosis-related infertility: Considerations and treatment options. *Clin Exp Reprod Med*. 2020;1(47):1-11.



142. Bilotas M, Olivares C, Ricci A, Baston J, Bengochea T, Meresman G, et al. Interplay between Endometriosis and Pregnancy in a Mouse Model. *PLoS One*. 2015;4(10):e0124900.
143. Greaves E, Critchley H, Horne A, Saunders P. Relevant human tissue resources and laboratory models for use in endometriosis research. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;6(96):644-58.
144. Torres-Reverón A, Rana M, Gorabi V, Rivera-Lopez L, Appleyard C. Short treatment with antalarmin alters adrenal gland receptors in the rat model of endometriosis. *PLoS One*. 2020;1(15):e0227456.
145. Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2004;101:11094-8.
146. Gu Z-Y, Jia S-Z, Leng J-H. Establishment of endometriotic models: the past and future. *Chin Med J (Engl)*. 2020;14(133):1703-10.
147. Kiani K, Movahedin M, Malekafzali H, Mirfasihi F. Effect of the estrus cycle stage on the establishment of murine endometriosis lesions. *Int J Reprod Biomed*. 2018;5(16):305-14.
148. Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, Buttram VC, Besch PK, Kaufman RH. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1984;149:591-7.
149. Bergqvist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O. Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice. Morphologic effects of various steroid hormones. *American Journal of Pathology*. 1985;121:337-41.
150. Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J-I, Sato Y. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod*. 2005;6(20):1577-484.

151. Laganà A, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci.* 2019;22(20):5615.
152. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertility and Sterility.* 2000;74:306-12.
153. Grummer R, Schwarzer F, Bainczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Shindler AI. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Human Reproduction.* 2001;16:1736-43.
154. Guo Y, He B, Xu X, Wang J. Comprehensive analysis of leukocytes, vascularization and matrix metalloproteinases in human menstrual xenograft model. *PLoS One.* 2011;2(6):e16840.
155. Kobayashi A, Maegawa M, Yamamoto S, Ugumori N, Kasai Y, Tani A. The role of blood in early endometrial-peritoneal interactions in a syngeneic mouse model of endometriosis. *Reprod Med Biol.* 2010;1(10):15-20.
156. Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Sholtes H, Van Langendonck A. Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertility and Sterility.* 2005;84:492-9.
157. Sekiguchi K, Ito Y, Hattori K, Inoue T, Hosono K, Honda M, et al. VEGF Receptor 1-Expressing Macrophages Recruited from Bone Marrow Enhances Angiogenesis in Endometrial Tissues. *Sci Rep.* 2019;1(9):7037.
158. Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstetrics and Gynecology.* 1994;83:220-8.
159. Kaufmann R, Rudolphi A, Boxberger HJ, Hainzl A, Rosenthal H, Reimann J. Stable engraftment of human female genital mucous membrane xenografts on SCID mice. *Gynecology and Obstetrics Investigations.* 1995;40:97-100.

160. Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST. The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Human Reproduction*. 1999;14:3107-11.
161. Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, et al. Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Human Reproduction*. 2005;20:1695-701.
162. Luddi A, Marrocco C, Governini L, Semplici B, Pavone V. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Endometrium: High Levels in Endometriotic Lesions. *Int J Mol Sci*. 2020;8(21):2840.
163. Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen K. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87:4782-91.
164. Ferrero H, Buigues A, Martínez J, Simón C, Antonio Pellicer, Gómez R. A novel homologous model for noninvasive monitoring of endometriosis progression. *Biol Reprod*. 2017;2(96):302-12.
165. Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Philips SC, Smith SK. Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Human Reproduction*. 2005;20:350-8.
166. Tabibzadeh S, Miller S, Dodson WC, Satyaswaroop PG. An experimental model for the endometriosis in athymic mice. *Frontiers in Bioscience*. 1999;4:4-9.
167. MacKenzie WF, Casey HW. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys. *American Journal of Pathology*. 1975;80:341-4.
168. Nishimoto-Kakiuchi A, Netsu S, Okabayashi S, Taniguchi K, Tanimura H, Kato A, et al. Spontaneous endometriosis in cynomolgus monkeys as a clinically relevant experimental model. *Hum Reprod*. 2018;7(33):1228-36.

169. Dick EJ, Hubbard GB, Martin LJ, Leland MM. Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony. *Journal of Medical Primatology*. 2003;32:39-47.
170. Jagirdar J, Sirohi D, Dick Jr E, Hubbard G. Pleuro-pulmonary endometriosis in baboons (*Papio spp.*): insights into pathogenesis. *J Med Primatol*. 2013;1(42):39-45.
171. Story L, Kennedy S. Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR Journal*. 2004;45:132-8.
172. Tal A, Tal R, Shaikh S, Gidicsin S, Mamillapalli R, Taylor H. Characterization of cell fusion in an experimental mouse model of endometriosis. *Biol Reprod*. 2019;2(100):390-7.
173. Laura A Warren 1 AS, Susana Marquez Renteira 2, Tamer Seckin 3, Brandon Blau. Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. *Mol Med*. 2018;1(24)
174. Kyama C, Falconer H, Cuneo S, Chai D, Mihalyi A. Menstrual endometrial supernatant may induce stromal endometriosis in baboons. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2014(6):16-28.
175. Knutsen H, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüscheweiler B, Ceccatelli S, et al. Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA J*. 2018;11(16):e05333.
176. Gruber-Dujardin E, Bleyer M, Mätz-Rensing K. Morphological and immunohistochemical characterization of spontaneous endometriosis in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Primate Biol*. 2017;1(4):77-91.
177. Langoi D, Pavone M, Gurates B, Chai D, Fazleabas A, Bulun S. Aromatase inhibitor treatment limits progression of peritoneal endometriosis in baboons. *Fertil Steril*. 2013;3(99):656-62.
178. Fazkeabas AT, Brudney A, Chai D, Langoi D, Bulun SE. Steroid receptor and aromatase expression in baboon endometriotic lesions. *Fertility and Sterility*. 2003;80:820-7.

179. Simone Laganà A, Garzon S, Franchi M, Casarin J, Gullo G, Ghezzi F. Translational animal models for endometriosis research: a long and windy road. *Ann Transl Med.* 2018(22):431.
180. Da Broi M, Ferriani R, Navarro P. Etiopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2019;3(23):273-80.
181. Absenger Y, Hess-Stumpff H, Kreft B, Krazschmar J, Haendler B, Schutze N. Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Molecular Human Reproduction.* 2004;10:399-407.
182. Gashaw I, Hastings JM, Jackson KS, Winterhager E, Fazleabas AT. Induced endometriosis in the baboon (*Papio anubis*) increases the expression of the proangiogenic factor Cyr61 (CCN1) in eutopic and ectopic endometria. *Biology of Reproduction.* 2006;74:1060-6.
183. Qin Z, Li X, Yang J, Cao P, Qin C, Xue J, et al. VEGF and Ang-1 promotes endothelial progenitor cells homing in the rat model of renal ischemia and reperfusion injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;12(10):11896-908.
184. Dvorak H. Reconciling VEGF With VPF: The Importance of Increased Vascular Permeability for Stroma Formation in Tumors, Healing Wounds, and Chronic Inflammation. *Front Cell Dev Biol.* 2020(9):660609.
185. Parick AA, Ellis LM. The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2004;18:951-71.
186. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrinology Review.* 2004;25:581-611.
187. Wang X, Bove A, Simone G, Binyun Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol.* 2020(8):599281.
188. Lužnik Z, Anchouche S, Dana R, Yin J. Regulatory T Cells in Angiogenesis. *J Immunol.* 2020;10(205):2557-65.
189. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction

of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992;189:824-31.

190. Haibe Y, Kreidieh M, El Hajj H, Khalifeh I, Mukherji D. Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front Oncol*. 2020(10):221.

191. Hurwitz H, Fegrenbacher L, Novotny W, Carwright T, Hainsworth J, Heim W. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:2335-42.

192. Chaiworapongsa LF, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Goncalves LF. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;190:1541-6.

193. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:12605-8.

194. Ravikumar T, Shanmugasundaram N, Jayaraman V, Ramakrishnan K, Babu M. Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing. *Ann Burns Fire Disasters*. 2006;3(19):123-9.

195. Madu C, Wang S, Madu C, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020;15(11):4474-94.

196. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266:11947-54.

197. Apte R, Daniel S, Chen D, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;6(176):1248-64.

198. Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology. *Rep Biochem Mol Biol*. 2014;2(2):59-69.

199. Folkman J, Taylor S, Spillberg C. The role of heparin in angiogenesis. *Ciba Found Symposia*. 1983;100:132-49.
200. Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *American Journal of Pathology*. 2004;164:1531-5.
201. Cardones AR, Lionel LB. VEGF Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12:387-94.
202. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Bacic, F., Uematsu, S., McCarron, R.M. & Spatz, M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebromicrovascular endothelium. *Nature Medicine*. 2001;7(5):569-74.
203. Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebromicrovascular endothelium. *Journal of Neurochemistry*. 1991;57:1774-80.
204. Dinter E, Saridaki T, Diederichs L, Reichmann H, Falkenburger B. Parkinson's disease and translational research. *Transl Neurodegener*. 2020;1(9)
205. Goldstein M, Deutch AY. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB*. 1992;6:2413-21.
206. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev of Neuroscience*. 1999;22:123-44.
207. Egan MF, Weinberger DR. Neurobiology of schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology*. 1997;7:701-7.
208. Basu S, Dasgupta P. Role of dopamine in malignant tumor growth. *Journal of National Cancer Institute*. 2002;3(12):237-41.
209. Wick MM. Levodopa and dopamine analogs: melanin precursors as antitumor agents in experimental human and murine leukemia. *Cancer Treatment Reports*. 1979;63:991-7.

210. Wick MM. Levodopa and dopamine analogs as DNA polymerase inhibitors and antitumor agents in human melanoma. *Cancer Research*. 1980;40:1414-8.
211. Dasgupta PS, Lahiri T. Antitumor effect of i.p. dopamine in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1987;113:363-8.
212. Zeng C, Armando I, Luo Y, Eisner G, Felder R, Jose P. Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;2(294):551-69.
213. Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *Journal of Neurochemistry*. 1991;57:1774-80.
214. Brown L. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In: Goldberg I, Rosen E, editors. *Regulation of Angiogenesis*. Basel, Switzerland: Birkhauser; 1997.
215. Chia P, Andrew Teo A, Yeo T. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Front Med (Lausanne)*. 2020(7):542567.
216. Guo B-Q, Lu W-Q. The prognostic significance of high/positive expression of tissue VEGF in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2018;55(9):30552-60.
217. Corlan A, Cîmpean A, Melnic E, Raica M, Sarb S. VEGF, VEGF165b and EG-VEGF expression is specifically related with hormone profile in pituitary adenomas. *Eur J Histochem*. 2019;1(63):3010.
218. Nagai Y. Plasma levels of vascular endothelial growth factor in patients with acromegaly. *Hormone and Metabolic Research*. 2000;32:326-9.
219. Lee K, Kim S, Park S, Park H, Min K, Lee M. Hydrogen peroxide induces vascular permeability via regulation of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;2(35):190-7.



220. Wu G, Luo J, Rana JS, Laham R, Sellke FW, Li J. Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 2006;69:512-9.
221. Li T, Zhu Y, Han L, Ren W, Liu H, Qin C. VEGFR-1 Activation-Induced MMP-9-dependent Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *Future Oncol*. 2015;23(11):3143-57.
222. Malanchuk L, Martynyuk V, Malanchyn I, Kuchma Z, Krasnyanska L. Perspective management in the treatment of genital endometriosis in women with polymorphism of gens GSTT1 and GSTM1. *Georgian medical news*. 2017(272):33–7.
223. Sahin M, Sahin E, Gumuslu S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. *Angiology*. 2009;60:242-53.
224. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*. 2007;67:4507-13.
225. Fukuda R, Kelly B, Semenza GI. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E 2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Research*. 2003;63:2330-4.
226. Xu L, Stevens J, Hilton MB, Seaman S, Conrads TP, Veenstra T, et al. COX-2 Inhibition Potentiates Antiangiogenic Cancer Therapy and Prevents Metastasis in Preclinical Models. *Science Translational Medicine*. 2015;6(242):1-12.
227. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*. 2001;7:569-74.
228. Bhattacharya R, Sinha S, Yang SP, Patra C, Dutta S, Wang E. The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium. *Journal of Molecular Signaling*. 2008;3(14):112-8.

229. Teunis MA, Kavelaars A, Voest E, Bakker JM, Ellenbroek BA, Cools AR. Reduced tumor growth, experimental metastasis formation, and angiogenesis in rats with a hyperreactive dopaminergic system. *FASEB Journal*. 2002;16:1465-7.
230. Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *Journal of Cell Science*. 2009;122:3385-92.
231. Wang X, Khalil R. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol*. 2018(81):241-330.
232. Salamonsen L, Wooley D. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1(1824):146-56.
233. Kessenbrock K, Brown M, Werb Z. Measuring matrix metalloproteinase activity in macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Curr Protoc Immunol*. 2011(14):24.
234. Wenzl R, Heinzl H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest*. 1998(45):253-7.
235. Grzechocińska B, Dąbrowski F, Cyganek A, Panek G, Wielgoś M. The role of metalloproteinases in endometrial remodelling during menstrual cycle. *Ginekol Pol*. 2017;6(88):337-42.
236. Murphy G, Nguyen Q, Cockett M, Atkinson S, Allan J, Knight C, et al. Assessment of the role of the fibronectinlike domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem*. 1994(269):6632-6.
237. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018;10(18):3290.
238. Opdenakker G, Van den Steen P, Dubois B, Nelissen I. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 2001(69):851-9.

239. Jana S, Chatterjee K, Ray A, DasMahapatra P, Swarnakar S. Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity by COX-2-PGE2-pAKT Axis Promotes Angiogenesis in Endometriosis. *PLoS One*. 2016;10(11)

240. Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, et al. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod*. 2004(19):1257–64.

241. Sherbet G. *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*: Elsevier; 2011. 368 p.

242. Барбе АМ, Бербець АМ, Давиденко ІС, Юзько ОМ. Експериментальна модель ендометріозу на щурах. Клінічна та експериментальна патологія 2019;18(3 (69)):03-9.

243. Барбе АМ, Бербець АМ. Спосіб індукції експериментального ендометріозу у щурів: патент на корисну модель №141838 Україна, МПК (2006) А61В 10/00, G01N 33/50 (2006.01). № u201910876; патентовласник Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет» (UA); заявл. 04.11.2019; опубл. 27.04.2020, Бюл. №8. 2019

244. Quereda F, Barroso J, Acien P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1996;67:35-40.

245. Varghese F, Bukhari A, Malhotra R. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS One*. 2014;5(9)

246. Taylor C, Levenson R. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006(49):411–24.

247. Jafari S, Hunger R. IHC Optical Density Score: A New Practical Method for Quantitative Immunohistochemistry Image Analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;1(25):e12-e3.

248. Барбе АМ, Бербець АМ, Барбе КМ, Юзько ОМ. Сучасні погляди на патогенез екстрагенітального ендометріозу (Огляд літератури). Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;3:13-20.

249. Барбе АМ. Сучасні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу. Тези доповідей 85-ої науково-практичної конференції студентів і молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині» Івано-Франківськ: ІФНМУ; 2016. р. 215.

250. Барбе АМ. Гомологічні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу на гризунах. Збірник тез XIV-ої щорічної науково-практичної конференції “Uzhhorod Medical Students Conference”; Ужгород: УжНУ; 2016. р. 18.

251. Elgamal AD, Othman E-ER, Agmed FS. Ultrastructural Features of Eutopic Endometrium in a Rat Model of Endometriosis. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2016;4(1):20-7.

252. Rezende AC, Silva LA, Junior LJ, Gobbi H, Martins MM. Experimental model for endometriosis. Comparative histological study between the ectopic and eutopic endometrium. *Acta Cirurgica Brasileira*. 1997;12(4):226-30.

253. Neto JN, Torres OJ, Coelho TM, Junior JN. Evaluation of the macroscopic growth degree of experimental endometriosis in rats. *Arta Chirurgica Brasileira*. 2007;22(1):250-8.

254. Amaral VF, Lago EA, Kondo W, Guarita-Souza LC, Francisco JC. Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Revista do Colegio BRasileiro de Cirurios*. 2009;36(3):120-5.

255. Барбе АМ. Патофізіологічні процеси та імунна дисфункція при ендометріозі. XIII Міжнародна конференція студентів і молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» Збірник тез конференції: ХНМУ; 2016. р. 70.

256. Барбе АМ, Волкова ДЕ. Експериментальна модель ендометріозу на самках білих статевозрілих щурів. Всеукраїнський журнал студентів та молодих вчених "Хист". 2016(18):12.

257. Барбе АМ, Бербець АМ, Юзько ОМ. Особливості експериментального ендометріозу при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019(2):75-82.

258. Барбе АМ. Роль вазоендотеліального фактору росту судин (VEGF) при ендометріозі. Матеріали XX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; Тернопіль 2016. р. 198.

259. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Yuzko V, Yuzko O. The effects of certain angiogenesis inhibitors in experimental endometriosis in rats. Cell and Organ Transplantology. 2019;2(7):140-7.

260. Oliveira M, Raymundo T, Soares L, Pereira T, Evangelista Demôro A. How to Use CA-125 More Effectively in the Diagnosis of Deep Endometriosis. Biomed Res Int. 2017(2017)

261. Fiala L, Bob P, J R. Oncological Markers CA-125, CA 19-9 and Endometriosis. Medicine (Baltimore). 2018;51(97)

262. Mckinnon B, Mueller M, Nirgianakis K, Bersinger N. Comparison of Ovarian Cancer Markers in Endometriosis Favours HE4 Over CA125. Mol Med Rep. 2015;4(12)

263. Dean R, Butler G, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Brigstock D, Courty J, et al. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. Mol Cell Biol. 2007;24(27):8454-65.

264. Raza S, Cornelius L. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. J Invest Dermat Symp Proceed. 2000(5):47-54.

265. Woessner J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*. 1991(5):2145–54.
266. Amalinei C, Cianga C, Balan R, Cianga P, Giusca S, ID C. Immunohisto-chemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium. *Ann Anat*. 2011;1(193):43–55.
267. Stilley J, Birt J, Sharpe-Timms KL. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res*. 2021;3(349):849-62.
268. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Koval H, Yuzko V, Yuzko O. Expression and significance of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in endometriosis. *Journal of Medicine and Life*. 2020;1(13)
269. Young V, Ahmad S, JK B, Duncan W, Horne A. Peritoneal VEGF-A Expression Is Regulated by TGF- $\beta$ 1 Through an ID1 Pathway in Women With Endometriosis. *Sci Rep*. 2015(5)
270. Ranganathan P, Pramesh C, Aggarwal R. Common pitfalls in statistical analysis: Logistic regression. *Perspect Clin Res*. 2017;3(8)
271. DeLong E, DeLong D, Clarke-Pearson D. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988(44):837-45.
272. Kim S-H, Song Y-S, Hwang S-Y, Min K-S, Yoon J-T. Effects of hormones on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in bovine spermatozoa. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2013;3(26):334-42.
273. Sui X, Li Y, Sun Y, Chunyan L, Li X, Zhang G. Expression and Significance of Autophagy Genes LC3, Beclin1 and MMP-2 in Endometriosis. *Exp Ther Med*. 2018;3(16)
274. Holloway O, Neely C, Yuan X, Zhang Y, Ouyang J, Cantrell D, et al. Evaluating the Performance of a Predictive Modeling Approach to Identifying Members at High-Risk of Hospitalization. *J Med Econ*. 2020;3(23):228-34.

## ДОДАТОК А

### Список публікацій дисертанта

1. Барбе АМ, Бербець АМ, Давиденко ІС, Юзько ОМ. Експериментальна модель ендометріозу на щурах. Клінічна та експериментальна патологія. 2019;18(3):3-9. doi: <https://doi.org/10.24061/1727-4338.XVIII.3.69.2019.1> *(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

2. Барбе АМ, Бербець АМ, Юзько ОМ. Особливості експериментального ендометріозу при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;2:75-82. doi: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2019.v0.i2.10372> *(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

3. Барбе АМ, Бербець АМ, Барбе КМ, Юзько ОМ. Сучасні погляди на патогенез екстрагенітального ендометріозу (Огляд літератури). Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;3:13-20. doi: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2019.v.i3.10494> *(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

4. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Yuzko V, Yuzko O. The effects of certain angiogenesis inhibitors in experimental endometriosis in rats. Cell and Organ Transplantology. 2019;7(2):140-7. (SCOPUS) doi: [10.22494/cot.v7i2.101](https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.101) *(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

5. Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Koval H, Yuzko V, Yuzko O. Expression and significance of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in endometriosis. Journal of Medicine and Life.

2020;13(3):314-20. (SCOPUS) doi: <https://doi.org/10.25122/jml-2020-0117>

*(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

6. Барбе АМ, Волкова ДЕ. Експериментальна модель ендометріозу на самках білих статевозрілих щурів. Хист. 2016;18:12. *(Дисертант виконав дослідження, статистично опрацював, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував статтю до друку).*

7. Барбе АМ. Сучасні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу. В: Рожко ММ, редактор. Матеріали 85-ї наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених із міжнар. участю Інновації в медицині; 2016 Бер 24-25; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2016, с. 215-6. *(Дисертант провів комплекс досліджень, статистично опрацював та проаналізував матеріал, підготував тези до друку).*

8. Барбе АМ. Гомологічні експериментальні моделі зовнішнього генітального ендометріозу на гризунах. В: Смоланка ВВ, укладач. Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. студентської конференції Науковий потенціал молоді – прогрес медицини майбутнього; 2016 Кві 20-23; Ужгород. Ужгород: Говерла; 2016, с. 195-6. *(Дисертант провів комплекс досліджень, статистично опрацював та проаналізував матеріал, підготував тези до друку).*

9. Барбе АМ. Патофізіологічні процеси та імунна дисфункція при ендометріозі. В: Матеріали XIII міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Актуальні питання сучасної медицини; 2016 Кві 14-16; Харків. Харків; 2016, с. 71-2. *(Дисертант провів комплекс досліджень, статистично опрацював та проаналізував матеріал, підготував тези до друку).*

10. Барбе А. Роль вазоендотеліального фактору росту судин (VEGF) при ендометріозі. В: Корда ММ, редактор. Матеріали XX міжнар. медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2016 Кві 25-27; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2016, с. 198. *(Дисертант провів комплекс досліджень,*



*статистично опрацював та проаналізував матеріал, підготував тези до друку).*

11. Барбе АМ, Бербець АМ, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», патентовласник. Спосіб індукції експериментального ендометріозу у щурів. Патент України № 141838. 2020 Кві 27. *(Дисертант провів дослідження, проаналізував та узагальнив результати, підготував заявку на корисну модель).*

## ДОДАТОК Б

### **Відомості про апробацію:**

- III Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих вчених (м. Чернівці, 6-8 квітня 2016 р.) *(усна доповідь та публікація тез)*.
- 85-а науково-практична конференція студентів і молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині» (м. Івано-Франківськ, 24-25 березня 2016 р.) *(усна доповідь та публікація тез)*.
- XIV Міжнародна науково-практична студентська конференція «Науковий потенціал молоді – прогрес медицини майбутнього» (м. Ужгород, 20-23 квітня 2016 р.) *(публікація тез)*.
- XIII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 14-15 квітня 2016 р.) *(публікація тез)*.
- XX Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р.) *(усна доповідь та публікація тез)*.

## ДОДАТОК В

### Стандартні операційні процедури використані під час проведення експериментального дослідження

#### Стандартна операційна процедура №1: Індукція експериментального ендометріозу у щурів

1. Знерухомити щура за шкіру спини за допомогою лівої руки і ввести внутрішньоочеревинно за допомогою інсулінового шприца 0,18 мл кетаміну + 0,07 мл ксилазину, розчинених в 1 мл фізіологічного розчину (на 200 грам маси тіла) за допомогою правої руки. Покласти щура в окрему клітку. Дочекатись ефекту знечулення (близько 5 хв.).
2. Закріпити щура на підставці за допомогою ниток за усі 4 лапи черевом догори. Змочити очі за допомогою фізіологічного розчину. Поголоти шерсть на череві. Обробити шкіру щура розчином йоду двічі.
3. Одягнути стерильні хірургічні рукавиці.
4. Обкласти операційне поле двома стерильними серветками.
5. Виконати оперативне втручання:
  - зробити пошаровий поздовжній розріз черева щура у нижній половині (приблизно 0,8-1,2 см);
  - розкрити очеревинну порожнину;
  - ідентифікувати лівий ріг матки і вивести його в рану;
  - накладити затискач на відстані біля 2 мм від біфуркації матки та на яєчниковій зв'язці. Накласти 2 поліамідні лігатури 6-0. Видалити сегмент рогу матки та маткову трубу. Досягнути гемостазу;
  - видалити обидва яєчники. Досягнути гемостазу;

- зробити поздовжній розріз рогу матки, розгорнути його, поділити на прямокутні клапті (приблизно 5x3 мм);
  - відсепарувати край очеревини з розрізу (внутрішній бік парієнтальної очеревини);
  - двома вузловими швами закріпити клапоть рогу матки слизовою оболонкою оберненою в сторону очеревинної порожнини до очеревини в кількості 2-ох;
  - безперервним поліамідним швом зашити очеревину та м'язевий шар і шкіру.
6. Покласти щура в окрему клітку з підігрівом.
  7. Виконати СОП №2.
  8. Дочекатися, поки щур прокинеться.
  9. Покласти щура в дослідну клітку
  10. Дати щуру пиття ad libitum.

**Стандартна операційна процедура №2: Гормональна підтримка щурів після оваріектомії**

1. 2 мг естрогену валерату розчинити в 32 мл стерильного розчину натрію хлориду 0,9% та 3 мл розчину декасану 0,02% у стерильному хімічному посуді, утворивши 35 мл розчину.
2. Набрати інсуліновим шприцем 0,1 мл утвореного розчину.
3. Знерухомити щура, натягнути шкіру на спині вгору утворивши трикутник, обробити спиртом.
4. Увести розчин підшкірно, розмістивши шприц під кутом 45°.
5. Повторювати щодня.

**Стандартна операційна процедура №3: Евтаназія щура та забір біологічного матеріалу**

1. Розчинити 1 г сухої речовини тіопенталу натрію у 20 мл розчину натрію хлориду 0,9%.
2. За допомогою інсулінового шприца набрати 0,1 мл утвореного розчину. Зафіксувавши щура за допомогою лівої руки, увести розчин внутрішньоочеревинно за допомогою правої руки
3. Покласти щура в окрему клітку та дочекатися знечулення (біля 3-5 хв.).
4. Взяти щура за шкіру спини за допомогою лівої руки та за допомогою хірургічних ножиць у правій руці розітнути шкіру, передні м'язи шиї та судини. Кров збирати за допомогою хімічної скляної лінійки у пробірки об'ємом 9 мл.
5. Покласти щура на препаратийний столик. За допомогою пінцету та хірургічних ножиць розітнути передню черевну стінку у вигляді «П», розпочинаючи від лівого реберного кута, продовжуючи до правого, а потім донизу до правої клубової ділянки та згодом до лівої клубової ділянки.
6. Розкрити черевну порожнину, ідентифікувати ендометріюідні ураження.
7. Поклавши поряд з ними міліметрову прозору офісну лінійку за допомогою фотоапарата виконати фотофіксацію зображення.
8. Провести макроскопічну оцінку уражень та виміряти діаметри уражень.
9. За допомогою хірургічного пінцету та ножиць відсепарувати ендометріюідні ураження (при наявності) від підлеглих тканин, при необхідності промити в дистильованій воді, покласти в індивідуальні ємності та залити буферизованим розчином формаліну.
10. Рештки тварини утилізувати згідно правил дослідної лабораторії.


## ДОДАТОК Г.1

Затверджую  
 Директор КЗОЗ «Медичний  
 центр лікування безпліддя»  
 к.мед.н. Юзько Т.А.  
 «28» 10 2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва роботи:** «Застосування логістичної регресійної моделі на основі даних рівня експресії матриксних металопротеїназ (ММР-2 та ММР-9) у ектопічному ендометрію та СА-125 та HE-4 у венозній крові для ранньої діагностики зовнішнього генітального ендометріозу».
2. **Автори:** Барбе Адріан Михайлович, аспірант кафедри акушерства та гінекології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»;  
Андрієць Анатолій Володимирович, асистент кафедри акушерства та гінекології та перинатології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»;  
Юзько Вікторія Олександрівна, аспірант кафедри акушерства та гінекології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»;
3. **Установа розробник:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»
4. **Джерела інформації:**
  - Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Yuzko V, Yuzko O. The effects of certain angiogenesis inhibitors in experimental endometriosis in rats. Cell and Organ Transplantation. 2019;2(7):140-7 <https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.101>.
  - Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Koval H, Yuzko V, Yuzko O. Expression and significance of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in endometriosis. Journal of Medicine and Life. 2020;3. <https://dx.doi.org/10.25122%2Fjml-2020-0117>
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя», м. Чернівці
6. **Термін впровадження:** вересень-грудень 2020 року
7. **Форми впровадження:** результати дослідження впроваджено у діагностичний процес.

Науковий керівник КЗОЗ «Медичний  
 центр лікування безпліддя»,  
 д.мед.н., професор

 Юзько О.М.

## ДОДАТОК Г.2

Затверджую  
 Проректор з науково-педагогічної роботи  
 Вищого державного навчального закладу України  
 «Буковинський державний медичний університет»  
 доц. І.В. Геруш  
 « 20 09 2020 » 20 20 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва роботи:** «Можливості вивчення зовнішнього генітального ендометріозу за допомогою експериментальної моделі на щурах».
2. **Автори:** Барбе Адріан Михайлович, аспірант кафедри акушерства та гінекології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»;  
Бербець Андрій Миколайович, доцент кафедри акушерства та гінекології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»;
3. **Установа розробник:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»
4. **Джерела інформації:**
  - Барбе А.М., Бербець А.М., Давиденко І.С., Юзько О.М. Експериментальна модель ендометріозу на щурах. Клінічна та експериментальна патологія Т.18, №3 (69). С.03-09.
  - Барбе А.М., Бербець А.М., Юзько О.М. Особливості експериментального ендометріозу при застосуванні агоніста дофамінових рецепторів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;2:75-82
  - Barbe A, Berbets A, Davydenko I, Yuzko V, Yuzko O. The effects of certain angiogenesis inhibitors in experimental endometriosis in rats. Cell and Organ Transplantology. 2019;2(7):140-7 <https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.101>.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патофізіології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»
6. **Термін впровадження:** вересень-жовтень 2020 року
7. **Форми впровадження:** результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний матеріал.

Завідувач кафедри  
 патофізіології Вищого  
 державного навчального закладу  
 України «Буковинський державний  
 медичний університет»,  
 д.мед.н. професор

Роговий Ю.Є.

