

Заключение диссертационного совета Д 208.125.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации

по диссертационную работу
Альмовой Индиры Курманбиевны

«Клинико – морфологические особенности и экспрессия микроРНК у больных ретроцервикальным эндометриозом», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.01 – акушерство и гинекология

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

показана значимость клинико-морфологических, инструментальных и молекулярно-биологических данных в диагностике ретроцервикального эндометриоза.

уточнена диагностическая информативность ТВУЗИ, МРТ и колоноскопии при ретроцервикальном эндометриозе.

установлено, что повышение экспрессии hsa-miR-143-3p характерно для эндометриоза, тогда как повышение экспрессии hsa-miR-200a-3p свидетельствует о наличии таких пролиферативных заболеваний матки, как миома и полип эндометрия. В тканях эутопического эндометрия больных эндометриозом выявлены дифференциально экспрессированные гены, которые могут быть потенциальными маркерами данной патологии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Впервые посредством секвенирования выявлены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК в эктопическом эндометрии у пациенток с ретроцервикальным эндометриозом.

Показаны отличия в экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии больных эндометриозом и без данного заболевания.

Расширено теоретическое представление о патогенезе эндометриоза на основе анализа биоинформационных баз данных и изучения генов-мишеней,

регулируемых выявленными дифференциально экспрессирующимися микроРНК, участвующих в процессах дифференцировки и жизнеспособности клеток, воспаления и окислительного стресса.

Оценка достоверности результатов выявила, что результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов проведения исследования: ультразвуковое исследование на аппаратах экспертного класса с цифровой обработкой ультразвукового сигнала «Aloka SSD-680», «Toshiba-38A» («Toshiba», Япония), «AcusonAntares» («Simens», Германия,), магнитно-резонансная томография с помощью МР-томографа “Magnetom Harmony” (Simens Medical Systems, Германия).

При распространенных формах ретроцервикального эндометриоза и наличии специфических жалоб, с целью исключения или подтверждения прорастания эндометриоидного инфильтрата в стенку кишки, выполнялась колоноскопия по стандартной методике. Хирургическое лечение проводили в условиях эндотрахеального наркоза по стандартной методике в положении Тренделенбурга. Объем оперативного вмешательства у пациенток зависел от исходного диагноза и степени распространения ретроцервикального эндометриоза. Всем больным с РЦЭ иссечены очаги ретроцервикального эндометриоза, части больным (n=30/120) – выполнена резекция яичников, кишки (n=30/120), по поводу инфильтративного роста, также у некоторых больных (n=30/120) с миомой матки выполнена энуклеация миоматозного/ых узла/ов во время оперативного вмешательства, при полипе эндометрия (n=15/30) – полипэктомия и отдельное диагностическое выскабливание слизистой полости матки и цервикального канала под контролем гистероскопии.

Морфологическое исследование гистологических материалов проводилось по стандартной общепринятой методике.

Для молекулярного анализа образцы подбирались с учётом данных морфологического исследования. **Выделение РНК из тканей эндометрия**

Полученные при хирургическом вмешательстве образцы тканей промывали в 0,9% NaCl и мгновенно замораживали в жидком азоте для последующего хранения при -80°C. Выделение суммарной РНК из тканей производили с использованием набора miRNeasy Micro Kit (Qiagen) с последующей очисткой и обогащением фракцией микроРНК набором RNeasyMinElute Cleanup Kit (Qiagen) в соответствии с протоколами производителя. Измерение концентрации РНК проводили с использованием флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen™), качество образца суммарной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза с использованием набора RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) в биоанализаторе Agilent Bioanalyzer 2100. Для дальнейших исследований использовали образцы суммарной РНК с соотношением молярных концентраций рибосомальных РНК (28S и 18S), равным 1,5-1,8 и RIN индексом не менее 7.

Выделение РНК из плазмы периферической крови

Образцы венозной крови женщин с ретроцервикальным эндометриозом собирали в пробирки VACUETTE® с ЭДТА. Далее проводили центрифугирование в течение 20 минут при 300g (4°C), отбирали плазму, и повторно центрифугировали в течение 10 минут при 14500g. РНК выделяли из 200 мкл плазмы крови с использованием набора Serum Plasma (Qiagen) с добавлением $5,6 \times 10^8$ копий синтетической мкРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. cel-miR-39 использовали в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной ПЦР в реальном времени.

Транскриптомный анализ

Профили экспрессии микроРНК определяли методом секвенирования нового поколения на платформе Illumina. Для создания библиотек кДНК и последующего секвенирования использовали выделенную тотальную РНК из отобранных на основании клиничко-анамнестических данных образцов. Библиотеки кДНК готовили с использованием наборов NEBnext, в

соответствии с протоколами производителя. Измерение концентрации библиотек кДНК проводили с использованием флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen™), качественный анализ библиотек проводили методом капиллярного электрофореза в биоанализаторе Agilent Bioanalyzer 2100. Секвенирование проводили на приборе Illumina NextSeq с использованием реагентов и расходных материалов фирмы Illumina (NextSeq 500/550 High Output v2 kit). Качество секвенирования оценивали при помощи сервиса BaseSpace (Illumina) по следующим параметрам: плотность кластеров, интенсивность сигнала в каналах детекции, доля кластеров, прошедших фильтр, по выходу выровненных прочтений (все вышеперечисленные параметры не выходили за пределы допустимых значений).

Также оценка экспрессии микроРНК проводилась методом ПЦР в реальном времени. Для этого выделенная тотальная РНК, включающая микроРНК, была преобразована в кДНК с использованием набора miScript II RT (Qiagen), в соответствии с протоколами производителя. Набор miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) использовали для приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР в реальном времени. Реакцию ПЦР проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) в следующей последовательности: 15 минут при 95°C, далее 40 циклов по 15 секунд при 94°C, по 30 сек при оптимизированной температуре отжига праймеров (52-60°C) и по 30 сек при 70°C. В качестве эндогенного контроля для образцов ткани использовали SNORD68, для плазмы крови cel-miR-39.

Выделенную из тканей эндометрия тотальную РНК также использовали для исследования экспрессии генов. Для анализа брали 500 нг РНК каждого образца тканей. С помощью обратной транскрипции была синтезирована целевая кДНК, которая были фрагментирована, полученные фрагменты метили биотином согласно протоколу производителя (Affymetrix, США). Экспрессия генов определялась методом гибридизации на микрочипах (GeneChip Human Exon 1.0 ST Arrays, Affymetrix). Реакцию проводили на 60 об/мин, при 45°C, в течении 17 ч. Микрочипы затем промывали и окрашивали при помощи Fluidics

Station 450 (Affymetrix, США). Далее чипы анализировали при помощи лазерного сканера Affymetrix GeneChip 3000 7G (США). Получение файлов с изображениями микромассивов (DAT) осуществляли с помощью пакета программ Affymetrix GeneChip Command Console (version 0.0.0.676, Affymetrix). Анализ данных производили при помощи пакета программ Expression Console и Transcriptome Analysis Console (Affymetrix). Для выявления межгрупповых отличий в экспрессии генов использовали критерий ANOVA и поправку на множественные сравнения.

Биоинформационная обработка данных

Анализ структуры, качества и соответствия целевой длине прочтений проводили с использованием программы Fast QC. Последовательности нуклеотидов, полученные в результате секвенирования, подвергались процессингу при помощи программы Cutadapt 1.9.1 для удаления адаптеров, после чего рассчитывалось количество прочтений с адаптером и общее количество для оценки качества пробоподготовки и секвенирования и для возможности использования в дальнейшем анализе.

Выравнивание полученных последовательностей на референс мкРНК человека проводилось по базе данных miRBase версии 21 с использованием программы Bowtie 1.2. Сортировка, индексирование и слияние файлов для подсчета количества прочтений для дальнейшего анализа проводилась при помощи программы Samtools.

Оценку представленности каждой мкРНК в библиотеке и анализ дифференциальной экспрессии в группах с учетом множественных сравнений выполнялся в среде R при помощи пакета DeSeq2. Результаты анализа форматировались в табличном виде с указанием среднего количества прочтений для каждой мкРНК в группах сравнения, логарифма кратности изменений (\log_2FC), стандартной ошибки кратности изменений и значения вероятности ошибки первого рода, скорректированного после поправки на множественные сравнения, для гипотезы об отсутствии различий в экспрессии для каждой мкРНК в анализируемых группах.

Для всех групп сравнения в модель включалась информация о принадлежности к группе и о пациенте, от которого был забран материал. В результате обработки данных были получены наборы дэ-мкРНК для различных групп сравнения: эутопический (Eu) и эктопический (Ec) эндометрий.

В каждой группе была проведена фильтрация наборов по следующим параметрам: достоверность отличий с учетом множественных сравнений ($p < 0,05$) и кратность изменений ($FC \geq 2$).

Поиск генов-мишеней для мкРНК проводился при помощи базы валидированных взаимодействий miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>). Отбор мишеней проводился на основании информации о валидации взаимодействий мРНК-мкРНК двумя и более методами, в результате получали списки только тех генов-мишеней, для которых регуляторная роль мкРНК была экспериментально доказана. Анализ экспрессии генов проводили программой Transcriptome Analysis Console (Affymetrix, ThermoFisher). Обогащение путей внутриклеточной сигнализации и биологических процессов по базе данных KEGG (<http://www.genome.jp>) и Wik-ipathways (<http://www.wikipathways.org>) было проведено при помощи программы Cytoscape 3.4.09 и плагина JERETTO10.

Обработка полученных данных проводилась с использованием статистических пакетов Statistica V10, SPSS Statistics 22 и R v.3.5.

Идея исследования базируется на анализе данных анамнеза пациенток с ретроцервикальным эндометриозом, выявлении клиничко - морфологических факторов, диагностической ценности УЗИ, МРТ и колоноскопии, а также оценки экспрессии генов и микроРНК в тканях эктопического, эутопического эндометрия и плазме крови.

Теория построена на известных, проверяемых данных и фактах, согласуется с опубликованными данными по этиологии, патогенезу и диагностике эндометриоза [A. Vanhie et al., 2016.; B. Ata et al., 2017; Mounsey, A.L. et al., 2006], роли микроРНК в развитии эндометриоза [Yang, L., et al., 2014; Mari-Alexandre J. et al., 2016; Saare M. et al., 2014; Shi X.Y. et al., 2014],

эффективности инструментальных методов исследования в диагностике данного заболевания [Hudelist G. *et al.*, 2011; Bazot M. *et al.*, 2004; Friedlander M. R. *et al.*, 2014; Szabo. G. *et al.*, 2013].

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе темы исследования и ее методологической структуры, разработке цели и задач, обобщении, анализе, научной интерпретации и статистической обработке полученных результатов исследования. Диссертант самостоятельно производила забор биологического материала. Автор участвовала в операциях в качестве ассистента и осуществляла динамическое наблюдение больных в послеоперационном периоде.

Тема и содержание диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.01. – акушерство и гинекология и профилю диссертационного совета Д 208.125.01.

По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы в журналах, рекомендуемых ВАК, а также учебное пособие «Глубокий инфильтративный эндометриоз с вовлечением влагалища и/или толстой кишки».