

На правах рукописи

МЕЖЛУМОВА

Наталья Арсеновна

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ НАРУЖНОГО
ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА НА ОСНОВАНИИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Адамян Лейла Владимировна

кандидат химических наук

Бобров Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Ярмолинская Мария Игоревна – доктор медицинских наук, профессор РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», отдел эндокринологии репродукции, руководитель

Кира Евгений Федорович – доктор медицинских наук, профессор РАН, ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра женских болезней и репродуктивного здоровья, заведующий

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита состоится «17» ноября 2020 г. в 13 часов на заседании 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» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации <http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эндометриоз – одно из наиболее распространенных гинекологических заболеваний, которое встречается у 10% женщин репродуктивного возраста, обнаруживается у 35-50% женщин с тазовой болью и бесплодием и занимает 3-е место после воспалительных заболеваний и миомы матки [P.A. Rogers, 2017; Л.В. Адамян и соавт. 2019].

Установлено, что в основе патогенеза заболевания может лежать дисрегуляция гормональных, пролиферативных и иммунных реакций в тканях эктопического эндометрия [K. Hsiao, 2017; E. Rolla, 2019], однако на сегодняшний день имеется мало данных, указывающих на присутствие специфических молекулярных маркеров, характерных для эндометриоидных гетеротопий различной локализации [V. Nisenblat, 2016].

Золотым стандартом диагностики наружного генитального эндометриоза (НГЭ) является лапароскопия с прицельной биопсией подозрительных очагов и их последующим гистологическим исследованием [Л.В. Адамян, 2006]. Данный подход является инвазивным, трудоемким и дорогостоящим, кроме того, временной интервал между первым появлением симптомов и постановкой окончательного диагноза может достигать 8-11 лет [A. Fassbender, 2015].

Современные методы лечения эндометриоза ограничиваются хирургическим вмешательством, назначением гормональной терапии, направленной на купирование болевого синдрома и снижение вероятности рецидива заболевания, однако эти методы не всегда приводят к длительной ремиссии, устранению болевого синдрома и часто сопровождаются побочными эффектами и осложнениями [S. Soysal, 2004; D. Adamson, 2017]. При этом в значительной степени сохраняется вероятность рецидива заболевания. Частота рецидивов после хирургического лечения составляет 15-21% через 1-2 года, 36-47% через 5 лет и 50-55% вплоть до 7 лет наблюдения [P. Vercellini, 2018].

Несмотря на огромное количество исследований, патогенез развития НГЭ и его рецидивирования остается предметом дискуссии. В связи с этим оправдан

поиск достоверных, чувствительных и специфичных биомаркеров для ранней неинвазивной диагностики эндометриоза, которые позволят выявлять и прогнозировать возникновение рецидива заболевания на доклиническом этапе, а также определять возможную тактику ведения этих пациенток.

Степень разработанности темы исследования

В последнее время активно изучается роль малых некодирующих РНК, таких как мкРНК (microRNA) и пРНК (piwiRNA) в регуляции экспрессии генов как в норме, так и при патологии. Установлено, что данные РНК выполняют роль пост-транскрипционных репрессоров за счет взаимодействия с мРНК-мишенями, что приводит либо к деградации соответствующей мРНК, либо к остановке трансляции. Таким образом, дисбаланс регуляторных влияний малых РНК может приводить к изменению экспрессии генов-мишеней и вносить существенный вклад в развитие патологических процессов [M. Saare, 2017; S. Vjorkman, 2019]. Показаны отличия экспрессии мкРНК в эктопическом и эутопическом эндометрии, однако выяснение роли мкРНК, их генов-мишеней в патогенезе эндометриоза требует дальнейших исследований. Остается открытым вопрос о специфичности экспрессии мкРНК в зависимости от локализации эндометриоидного очага и фазы менструального цикла, а экспрессия пРНК (piwiRNA) и их роль в патогенезе эндометриоза остается практически не изученной.

Таким образом, идентификация малых РНК в патологически измененных тканях и эндометрии и определение роли регулируемых ими генов-мишеней в патогенезе различных форм эндометриоза представляется перспективным направлением исследований для разработки новых диагностических подходов и выявления фармакологических мишеней для терапии эндометриоза.

Цель исследования

Повышение эффективности методов диагностики и прогнозирования течения эндометриоза на основании определения значения микроРНК и их белков-мишеней в качестве патогенетических и диагностических маркеров различных форм наружного генитального эндометриоза у пациенток репродуктивного возраста.

Задачи исследования

1. Провести анализ клинико-анамнестических характеристик пациенток с различными формами наружного генитального эндометриоза, выделить особенности течения заболевания, хирургического лечения и частоты бесплодия у пациенток с эндометриоидными кистами яичников и ретроцервикальным эндометриозом.
2. Провести сравнительный анализ дифференциальной экспрессии малых РНК в тканях эутопического и эктопического эндометрия у больных с эндометриоидными кистами яичников и ретроцервикальным эндометриозом в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.
3. Определить дифференциальную экспрессию мкРНК и белков в стромальных клетках эктопического и эутопического эндометрия с использованием транскриптомного и протеомного анализа.
4. На основании биоинформационных баз данных и протеомного исследования определить потенциальные гены-мишени дифференциально экспрессированных мкРНК и регулируемые ими пути внутриклеточной сигнализации.
5. Изучить ближайшие и отдаленные результаты после лечения пациенток репродуктивного возраста с эндометриозом с целью оценки течения послеоперационного периода, восстановления репродуктивной функции и развития рецидивов заболевания.
6. Охарактеризовать совокупное значение всех изученных молекулярных маркеров в патогенезе эндометриоза и дать оценку их возможной роли в диагностике заболевания и прогнозировании его рецидивов.

Научная новизна

На основании проведенного исследования были выявлены клинико-анамнестические показатели, отражающие высокий риск развития эндометриоза, среди которых наиболее значимыми являются наследственная предрасположенность и наличие отягощенного преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе.

После оперативного лечения по поводу эндометриоза частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов

вспомогательных репродуктивных технологий, выше у женщин, которым выполняли иссечение очагов ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31. Беременность наступила у 52% женщин с бесплодием, обратившихся за оперативным лечением по поводу эндометриоза.

В результате анализа экспрессии мкРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия представлены и научно обоснованы новые данные о патогенезе наружного генитального эндометриоза. Впервые была проведена сравнительная оценка экспрессии мкРНК в тканях эндометриоидных кист яичников и ретроцервикальных гетеротопиях относительно тканей эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и у пациенток без данной патологии. Представлена оценка влияния фазы менструального цикла на экспрессию мкРНК в исследуемых тканях эндометрия. Выявлены характерные различия в экспрессии мкРНК в зависимости от локализации очага и фазы менструального цикла.

Проведен одновременный транскриптомный и протеомный анализ, который позволил выявить молекулярные маркеры (мкРНК и регулируемые ими белковые мишени) в стромальных клетках эктопического эндометрия. Сравнительный анализ образцов стромальных клеток эктопического эндометрия пациенток с рецидивом и без него определил потенциальные маркеры для прогнозирования рисков рецидивирования эндометриоза.

Впервые выявлено присутствие представителей класса пРНК (piwiRNA) в тканях эктопического эндометрия при эндометриозе, а также показана их дифференциальная экспрессия.

Практическая значимость

Подтвержден высокий риск развития эндометриоза у женщин с наследственной предрасположенностью к развитию заболевания и наличием отягощенного преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе.

Изучение ближайших и отдаленных результатов лечения показало высокую эффективность оперативного лечения, что подтверждается большой

частотой наступления беременности, в том числе самопроизвольной и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, а также низкой частотой развития рецидивов.

На основании проведенного анализа обоснована целесообразность и актуальность исследований молекулярных маркеров в тканях эктопического и эутопического эндометрия, позволяющих расширить представления о патогенезе эндометриоза и определить возможные молекулярные мишени для терапевтического воздействия.

Установленные отличия в экспрессии ряда мкРНК в эутопическом эндометрии у женщин, страдающих эндометриозом и без данной патологии, в перспективе могут иметь практическое применение, поскольку биопсия слизистой матки является малоинвазивной процедурой, а анализ маркерных РНК может служить дополнительным методом диагностики эндометриоза.

Проведение комплексного исследования молекулярных характеристик в тканях эндометрия позволит осуществить более тщательный клиничко-лабораторный контроль за течением заболевания. Мониторинг предложенных параметров позволит своевременно направлять пациенток для оперативного вмешательства и оценивать эффективность проводимого лечения.

Внедрение нового алгоритма диагностики эндометриоза позволит выявить заболевание на ранней стадии, своевременно назначить лечение и предотвратить возникновение рецидивов.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала анализ течения НГЭ, прогнозирование развития и возникновения его рецидивов. Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины (отбор больных и статистическая обработка результатов). Работа выполнена с использованием клинических, инструментальных, лабораторных, молекулярно-биологических и статистических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. К клинико-anamnestическим факторам риска развития наружного генитального эндометриоза относятся наличие преморбидного фона в виде перенесенных воспалительных заболеваний, а также отягощенный семейный анамнез у 25% пациенток с эндометриоидными кистами яичников и 44% с ретроцервикальным эндометриозом. Основные клинические проявления различных форм наружного генитального эндометриоза – боли внизу живота, болезненные менструации, диспареуния, наиболее выраженные при ретроцервикальном эндометриозе.
2. Вероятность наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, после оперативного вмешательства по поводу эндометриоза выше у женщин, которым было выполнено иссечение ретроцервикального эндометриоза.
3. Уровень экспрессии мкРНК зависит от локализации очага и фазы менструального цикла. В эутопическом эндометрии больных эндометриозом имеет место повышение экспрессии miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных диагностических маркеров эндометриоза. Выявленная дифференциальная экспрессия пРНК (piwiRNA) в тканях эндометрия, а также участие генов-мишеней пРНК в сигнальных каскадах, регулирующих процессы клеточного деления, могут свидетельствовать о возможном вкладе пРНК в патогенетические механизмы развития эндометриоза.
4. Стромальный компонент играет важную роль в тканевой экспрессии мкРНК в эндометриоидных кистах яичника. По данным протеомного анализа в стромальных клетках выявлено 18 белков, являющихся потенциальными мишенями дифференциально экспрессированных микроРНК. У больных с последующим рецидивом заболевания происходит изменение экспрессии белков статмин-1, кальпонин-1, аннексин-А4 и белка теплового шока А2 в стромальных клетках эндометриоидных кист яичника, что позволяет рассматривать данные белки в качестве потенциальных прогностических маркеров рецидива.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в определении и постановке цели и задач работы, разработке дизайна исследования, систематизации данных литературы и анализе клинико-anamнестических данных, участвовал в обследовании, оперативном лечении больных, их послеоперационном ведении и реабилитации. Автором проведен анализ медицинской документации, статистическая обработка данных и научное обобщение полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4, 5 паспорта «акушерства и гинекология».

Степень достоверности полученных результатов

Степень достоверности полученных результатов достигнута за счет математической обработки материала параметрическими и непараметрическими методами. Для оценки межгрупповых различий применяли критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов с доверительным интервалом 95%. Различия между статистическими величинами считались достоверными при $p < 0,05$.

Апробация работы

Основные результаты исследования представлены на II Национальном Конгрессе «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020), XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2020), XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 2020).

Апробация диссертации проведена на межклинической конференции (03.07.2020) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (03.08.2020, протокол № 25).

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные научные и практические данные внедрены в работу гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы, из них 3 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах печатного текста и состоит из введения, 4 глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, результатам собственных наблюдений, обсуждению полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 9 рисунками. Библиографический указатель содержит 299 источников, из них 55 отечественных и 244 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В зависимости от локализации наружного генитального эндометриоза 100 исследуемых пациенток были разделены на две группы: I – 55 пациенток с эндометриоидными кистами яичников, II группа – 45 пациенток с ретроцервикальным эндометриозом. Группу контроля составили 30 пациенток без эндометриоза, прооперированные по поводу трубно-перитонеального фактора бесплодия. Все женщины были прооперированы в отделении оперативной гинекологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в период с 2017 по 2019 гг.

Критерии включения: возраст пациенток 24-37 лет, наличие эндометриоидных кист яичников (ЭКЯ) и ретроцервикального эндометриоза (РЦЭ), отсутствие тяжелой сопутствующей соматической патологии, наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: возраст моложе 24 лет и старше 37 лет, наличие злокачественных новообразований в анамнезе, нарушение менструального цикла в анамнезе, прием гормональных препаратов в течение последних 6 месяцев до операции.

Хирургическое лечение проводили под эндотрахеальным наркозом. Объем оперативного вмешательства зависел от степени распространения НГЭ. Выполняли резекцию яичников и иссечение эндометриoidных очагов в пределах визуально здоровых тканей, гистероскопию и раздельное диагностическое выскабливание эндоцервикса и эндометрия с последующим гистологическим исследованием операционного материала.

Экспрессию малых РНК оценивали с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения на платформе Illumina (NextSeq) и методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Протеомное исследование состава белков стромальных клеток эндометрия проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Обработку данных транскриптомного и протеомного профилирования проводили при помощи биоинформационных программных пакетов и баз данных. Также использовали статистические программы StatSoft Statistica V10, IBM SPSS Statistics V22 и R V3.5.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Анализ клинико-anamнестических данных

Проведена оценка клинико-anamнестических особенностей у 100 пациенток с эндометриозом. Полученные данные показали, что средний возраст женщин с ЭКЯ составил $30,27 \pm 3,78$ лет, с РЦЭ – $32,89 \pm 3,73$ лет, тем самым можно заметить, что ЭКЯ образуются у пациенток в более молодом возрасте.

Наиболее частыми жалобами пациенток с НГЭ являются боли внизу живота, болезненные менструации, диспареуния, наиболее выраженные при ретроцервикальном эндометриозе (Рисунок 1). Хроническая тазовая боль – основная жалоба женщин с НГЭ. Именно боль, ассоциированная с эндометриозом, оказывает огромное влияние на качество жизни пациенток. Болевой синдром при НГЭ ежегодно становится причиной потери нескольких миллионов рабочих дней и имеет существенные экономические последствия [А. Fauconnier, 2005].

При оценке репродуктивной функции первичное бесплодие выявлено чаще у больных ЭКЯ – 28 (51%), чем у женщин с РЦЭ – 10 (22%), $p=0,004$.

Преморбидный фон отягощен воспалительными заболеваниями органов малого таза, которые имели место в анамнезе более половины пациенток с НГЭ (Рисунок 2).

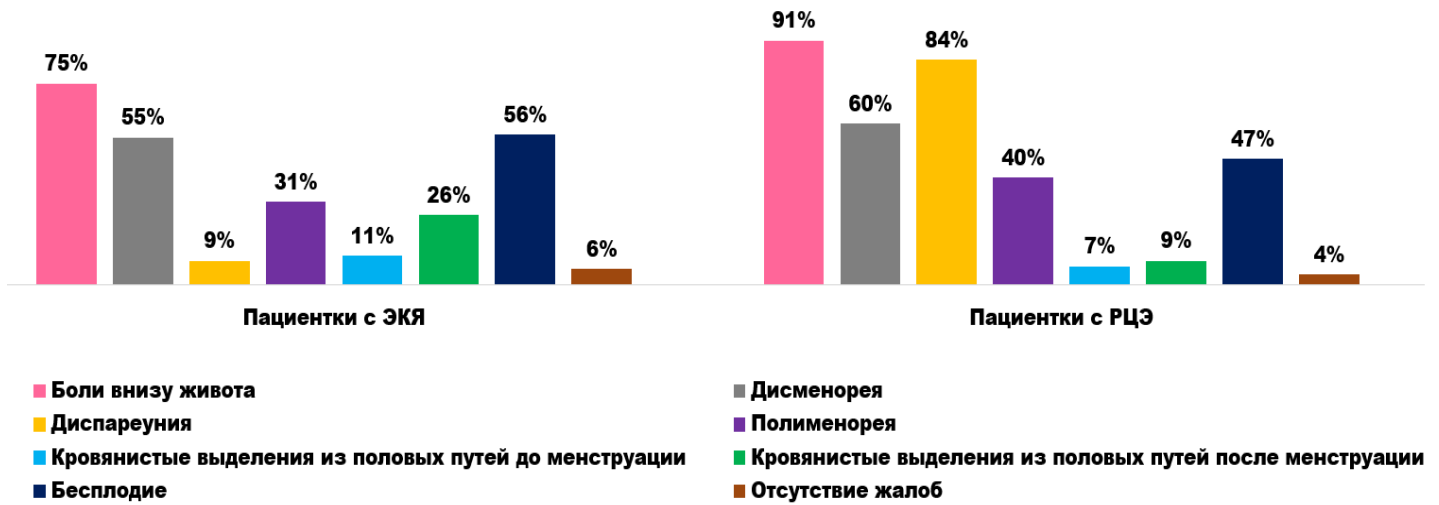


Рисунок 1. Структура жалоб, предъявляемых больными с НГЭ.

Одним из факторов, влияющих на возникновение и развитие эндометриоза, является наследственность [M. Matalliotakis, 2017], что подтверждается нашим исследованием. В обеих обследованных группах НГЭ в наследственном анамнезе встречался чаще, чем другие заболевания, причем у родственников пациенток с РЦЭ НГЭ отмечен в достоверно большем числе наблюдений – у 20 (44%), чем у женщин при эндометриоидных кистах яичников – 14 (25%), $p < 0,05$ (Рисунок 3).



Рисунок 2. Гинекологическая патология у пациенток с НГЭ.

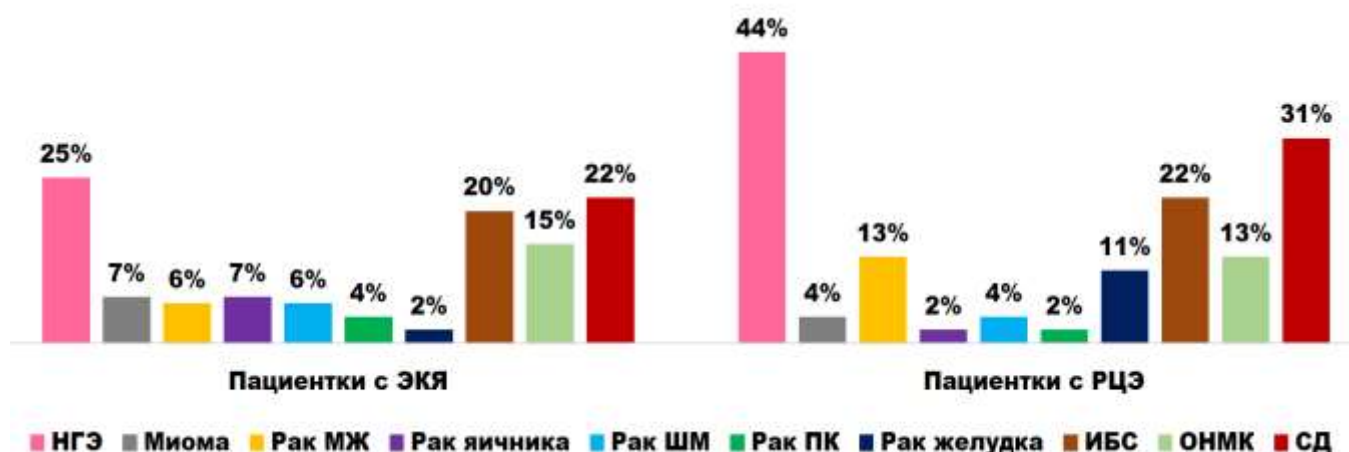


Рисунок 3. Наследственный анамнез у пациенток с НГЭ.

Все пациентки из групп исследования были оперированы по поводу НГЭ. Им выполнено лапароскопическое оперативное лечение с иссечением всех очагов НГЭ и их последующим гистологическим исследованием. Средняя продолжительность операции при ЭКЯ составила $60,11 \pm 3,70$ минут, при РЦЭ – $96,33 \pm 7,38$ мин ($p < 0,001$). Средняя интраоперационная кровопотеря у женщин с РЦЭ – $118 \pm 4,48$ мл, а у пациенток с ЭКЯ – $86 \pm 7,12$ мл ($p < 0,05$).

Послеоперационный период протекал без осложнений. Всем пациенткам проводилась ранняя восстановительная физиотерапия. Женщины находились под динамическим наблюдением с контрольным послеоперационным осмотром через 1 месяц после операции для определения дальнейшей тактики ведения в зависимости от результатов гистологического исследования, клинической картины и репродуктивных планов. При желании реализовать репродуктивную функцию планирование беременности было рекомендовано через 2-3 месяца после оперативного лечения. 60% больным после операции была назначена гормональная терапия с преимущественным использованием гестагенов. Каждая пациентка динамически наблюдалась нами в течение года. Рецидивы НГЭ выявлены у 21% исследуемых пациенток, при этом частота и скорость рецидивирования эндометриоза не зависели от локализации очагов заболевания.

Больные с бесплодием находились под наблюдением в течение 3 лет после проведенного хирургического лечения для оценки сроков и методов реализации репродуктивной функции. Беременность наступила у 52% женщин с

бесплодием, обратившихся за оперативным лечением. В среднем беременность наступала через 12-13 месяцев (включая контрацепцию в течение 3 месяцев).

Анализ способов реализации репродуктивной функции позволил выявить большую частоту спонтанных беременностей по сравнению с наступившими в результате применения методов ВРТ: 10 (31%) и 3 (10%) в группе ЭКЯ ($p=0,029$), 14 (66%) и 3 (14%) в группе РЦЭ ($p<0,001$). Эти данные свидетельствуют о высокой вероятности наступления самопроизвольной беременности после оперативного лечения пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, достоверно выше среди женщин, которые были прооперированы по поводу ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31, $p=0,06$.

Анализ экспрессии микроРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия

Методом секвенирования была проведена оценка экспрессии малых РНК в очагах эндометриоза ретроцервикальной локализации и эндометриоидных кистах яичника в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла. Для исследования отбирался биоматериал пациенток, у которых эндометриоидные гетеротопии выявлялись только в одной локализации. Для сравнения использовались парные образцы эутопического эндометрия больных эндометриозом, а также непарные образцы эндометрия пациенток, у которых данное заболевание не было обнаружено. Были проанализированы следующие группы сравнения для пролиферативной (1) и секреторной (2) фаз цикла: Ec/Eu – эктопический/эутопический эндометрий (парный), Eu/N – эутопический эндометрий больных и пациентов без патологии.

При ретроцервикальном эндометриозе было выявлено 50 общих дифференциально экспрессирующихся микроРНК (ДЭМ), а также 24 и 14 ДЭМ, уникальных для каждого сравнения (Ec/Eu-1 и Ec/Eu-2). В обоих сравнениях не было обнаружено ДЭМ с противоположно направленными изменениями экспрессии (Таблица 1).

В эндометриоидной кисте яичника при сравнении экспрессии относительно эутопического эндометрия в пролиферативную фазу обнаруживается 93 ДЭМ, из которых 42 с повышенной и 51 с пониженной экспрессией. В секреторную фазу было выявлено 117 ДЭМ, включающих 47 ДЭМ с повышенной и 70 с пониженной экспрессией. Сравнение списков ДЭМ для каждой фазы показало 35 общих мкРНК, а также 58 и 82 уникальных для пролиферативной и секреторной фаз, соответственно (Таблица 1). Таким образом, наблюдается больше фазовых отличий в эндометриоидной кисте по сравнению с очагами ретроцервикального эндометриоза.

Таблица 1. Список микроРНК, нечувствительных к локализации и фазе менструального цикла.

Киста-РЦ 1/2

— Пролиферативная
— Секреторная

Киста-РЦ 1/2					
Пролиферативная		Общие		Секреторная	
↑ Экспр.	↓ Экспр.	↑ Экспр.	↓ Экспр.	↑ Экспр.	↓ Экспр.
miR-1-3p	miR-106b-3p	miR-143-5p	miR-17-5p	miR-100-5p	miR-141-3p
miR-127-3p	miR-144-3p	miR-145-3p	miR-182-5p	miR-10a-3p	miR-142-3p
miR-139-5p	miR-144-5p		miR-183-5p	miR-133a-3p	miR-181b-5p
miR-143-3p	miR-15b-5p		miR-200a-3p	miR-95-3p	miR-200b-5p
miR-145-5p	miR-16-5p		miR-200a-5p		miR-30b-5p
miR-193b-3p	miR-185-5p		miR-200b-3p		miR-345-5p
miR-28-3p	miR-192-5p		miR-200c-3p		miR-375
miR-28-5p	miR-20a-5p		miR-203a-3p		miR-425-5p
miR-574-3p	miR-25-3p		miR-34c-5p		
	miR-486-5p		miR-449c-5p		
	miR-501-3p				
	miR-652-3p				
	miR-93-5p				
	miR-92a-3p				

Для выявления мкРНК, экспрессия которых не зависит от локализации, было произведено сравнение списков ДЭМ кисты и ретроцервикальных очагов в пролиферативную и секреторные фазы (Киста-РЦ 1, Киста-РЦ 2). При первом сравнении было выявлено 35 и 24 мкРНК, экспрессирующихся в обеих локализациях в пролиферативную и секреторную фазу, соответственно. Пересечение последних списков позволило выделить 12 мкРНК, экспрессия которых не зависит ни от локализации, ни от фазы менструального цикла (Таблица 2).

Наличие значительного числа уникальных ДЭМ при сравнениях как по локализациям, так и по фазам при различных типах эндометриоза указывает на то, что эти параметры должны учитываться при планировании экспериментов и сопоставлении различных наборов данных.

Таблица 2. Дифференциальная экспрессия мкРНК в очагах ретроцервикального эндометриоза и в эндометриоидной кисте яичника в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.



Сравнение Группа	Ес/Еу				
	Общие	Проллиферативная	Секреторная		
↑ (Кол-во)	22	12	7		
↓ (Кол-во)	28	12	7		
мкРНК ↑	let-7e-5p	miR-328-3p	miR-127-3p	miR-490-5p	
	miR-1-3p	miR-378a-3p	miR-133a-3p	miR-129-5p	
	miR-100-5p	miR-378a-5p	miR-193b-3p	miR-139-3p	
	miR-139-5p	miR-378c	miR-195-3p	miR-7706	
	miR-143-3p	miR-490-3p	miR-214-3p	miR-7704	
	miR-143-5p	miR-504-5p	miR-23a-3p	miR-10a-3p	
	miR-145-3p	miR-574-5p	miR-23b-3p	miR-27a-3p	
	miR-145-5p	miR-95-3p	miR-24-3p		
	miR-193a-5p	miR-99b-3p	miR-27b-3p		
	miR-28-3p		miR-3195		
	miR-28-5p		miR-574-3p		
	miR-320a		miR-99b-5p		
	miR-320c				
	мкРНК ↓	miR-106b-3p	miR-200b-3p	miR-101-3p	miR-141-3p
		miR-107	miR-200b-5p	miR-146a-5p	miR-142-3p
		miR-144-3p	miR-200c-3p	miR-148a-3p	miR-194-5p
		miR-144-5p	miR-20a-5p	miR-148a-5p	miR-196b-5p
miR-146b-5p		miR-34c-5p	miR-148b-3p	miR-199b-5p	
miR-15b-5p		miR-3529-3p	miR-192-5p	miR-30b-5p	
miR-16-5p		miR-375	miR-203a-3p	miR-425-5p	
miR-17-5p		miR-424-3p	miR-25-3p		
miR-182-5p		miR-451a	miR-26b-5p		
miR-183-5p		miR-486-5p	miR-429		
miR-185-5p		miR-501-3p	miR-449c-5p		
miR-186-5p		miR-652-3p	miR-629-5p		
miR-200a-3p		miR-93-5p	miR-92a-3p		
miR-200a-5p					

Сравнение Группа	Ес/Еу						
	Общие	Проллиферативная	Секреторная				
↑ (Кол-во)	13	29	34				
↓ (Кол-во)	22	29	48				
мкРНК ↑	miR-127-3p	let-7c-5p	miR-376c-3p	let-7a-2-3p	miR-22-3p	miR-6502-5p	
	miR-127-5p	miR-1-3p	miR-379-5p	miR-100-5p	miR-223-5p	miR-653-3p	
	miR-134-5p	miR-10b-5p	miR-382-3p	miR-1243	miR-30a-5p	miR-656-3p	
	miR-136-3p	miR-130a-3p	miR-409-3p	miR-130a-3p	miR-30b-5p	miR-874-5p	
	miR-143-5p	miR-136-5p	miR-409-5p	miR-133a-3p	miR-455-3p		
	miR-145-3p	miR-139-5p	miR-411-5p	miR-133b	miR-4649-3p		
	miR-202-5p	miR-143-3p	miR-493-3p	miR-134-3p	miR-4791		
	miR-381-3p	miR-145-5p	miR-495-3p	miR-135a-5p	miR-508-5p		
	miR-382-5p	miR-193b-3p	miR-508-3p	miR-154-5p	miR-510-5p		
	miR-493-5p	miR-199a-5p	miR-509-3p	miR-181d-5p	miR-514b-3p		
	miR-509-3-5p	miR-221-5p	miR-514a-3p	miR-202-3p	miR-514b-5p		
	miR-708-3p	miR-28-3p	miR-574-3p	miR-214-3p	miR-539-3p		
	miR-708-5p	miR-28-5p	miR-654-3p	miR-216a-3p	miR-539-5p		
		miR-29c-3p	miR-889-3p	miR-216a-5p	miR-592		
		miR-369-3p		miR-217	miR-615-3p		
	мкРНК ↓	miR-106a-5p	miR-20b-5p	let-7d-5p	miR-20a-5p	miR-127-3p	miR-381-3p
		miR-10a-3p	miR-34c-5p	miR-106b-3p	miR-25-3p	miR-127-5p	miR-382-5p
miR-10a-5p		miR-363-3p	miR-106b-5p	miR-3613-5p	miR-134-5p	miR-493-5p	
miR-141-3p		miR-375	miR-107	miR-429	miR-136-3p	miR-509-3-5p	
miR-142-3p		miR-425-5p	miR-1307-3p	miR-451a	miR-143-5p	miR-708-3p	
miR-142-5p		miR-449a	miR-135b-5p	miR-452-5p	miR-145-3p	miR-708-5p	
miR-17-5p		miR-449c-5p	miR-144-3p	miR-454-3p	miR-202-5p		
miR-182-5p			miR-144-5p	miR-484			
miR-183-5p			miR-15a-5p	miR-486-5p			
miR-196b-5p			miR-15b-3p	miR-501-3p			
miR-200a-3p			miR-15b-5p	miR-652-3p			
miR-200a-5p			miR-16-5p	miR-92a-3p			
miR-200b-3p			miR-185-5p	miR-93-5p			
miR-200c-3p			miR-192-5p	miR-96-5p			
miR-203a-3p			miR-194-5p				

Данные по экспрессии мкРНК, полученные в результате секвенирования, были валидированы методом ПЦР, для этого среди ДЭМ было отобрано несколько представителей с повышенной или пониженной экспрессией в группах сравнения, а также представители, для которых различий обнаружено не было. Для всех исследованных мкРНК наблюдался сходный характер изменений экспрессии при сравнении данных, полученных методами секвенирования и ПЦР (данные представлены в диссертации).

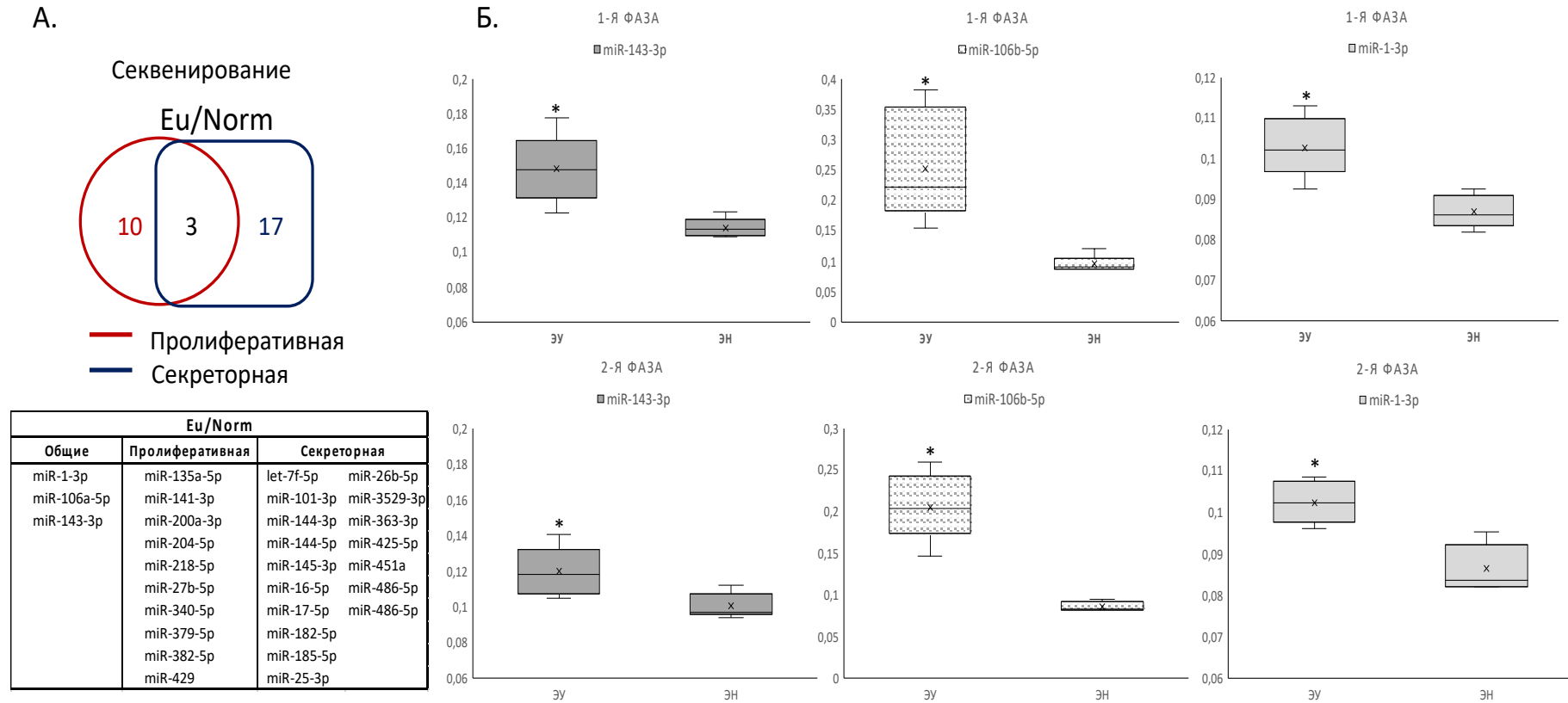
Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эутопическом эндометрии

Проведен сравнительный анализ экспрессии мкРНК в эутопическом эндометрии больных эндометриозом относительно пациентов без данной патологии в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла. По данным секвенирования выявлено 13 ДЭМ в эутопическом эндометрии в пролиферативную фазу и 20 ДЭМ в секреторную фазу цикла. Пересечение списков ДЭМ для обеих фаз показало три мкРНК общих для обеих фаз: miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p (Таблица 3А). Для всех исследуемых мкРНК установлено повышение экспрессии в эутопическом эндометрии у пациенток с эндометриозом (Таблица 3Б). Очевидно, экспрессия данных мкРНК не чувствительна к фазе цикла, что в перспективе может служить положительным фактором для отбора указанных мкРНК в качестве маркеров патологического эндометрия при эндометриозе.

Экспрессия микроРНК в стромальных клетках эндометрия

При изучении содержания мкРНК в тканях оценивается суммарная экспрессия, вклад в которую вносят все типы клеток, содержащиеся в образце. По данным гистологических исследований, в тканях эндометриоидных кист яичников наблюдается преобладание стромального компонента, тогда как эпителиальный компонент менее выражен. Нами была отработана методика получения популяции клеток из тканей кист, на 90% состоящих из стромальных клеток. Клетки выделяли из образцов тканей, полученных в пролиферативную фазу цикла. Сразу после выделения из тканей клетки использовались для анализа состава мкРНК методом секвенирования с целью уточнения вклада стромального компонента в тканевую экспрессию. Было выявлено 57 дифференциально экспрессирующихся пРНК (ДЭП), из которых 39 демонстрировали повышенную

Таблица 3. Изменение экспрессии мкРНК в эутопическом эндометрии больных эндометриозом в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла.



А. Дифференциальная экспрессия мкРНК в тканях эутопического эндометрия (Eu) больных ретроцервикальным эндометриозом относительно тканей нормального эндометрия (Norm) по данным секвенирования.

Б. Повышение экспрессии miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p в пролиферативную и секреторную фазы менструального цикла по данным ОТ-ПЦР (Эу – эутопический, Эн – нормальный эндометрий; значения представлены в виде $1/\Delta\Delta Ct$).

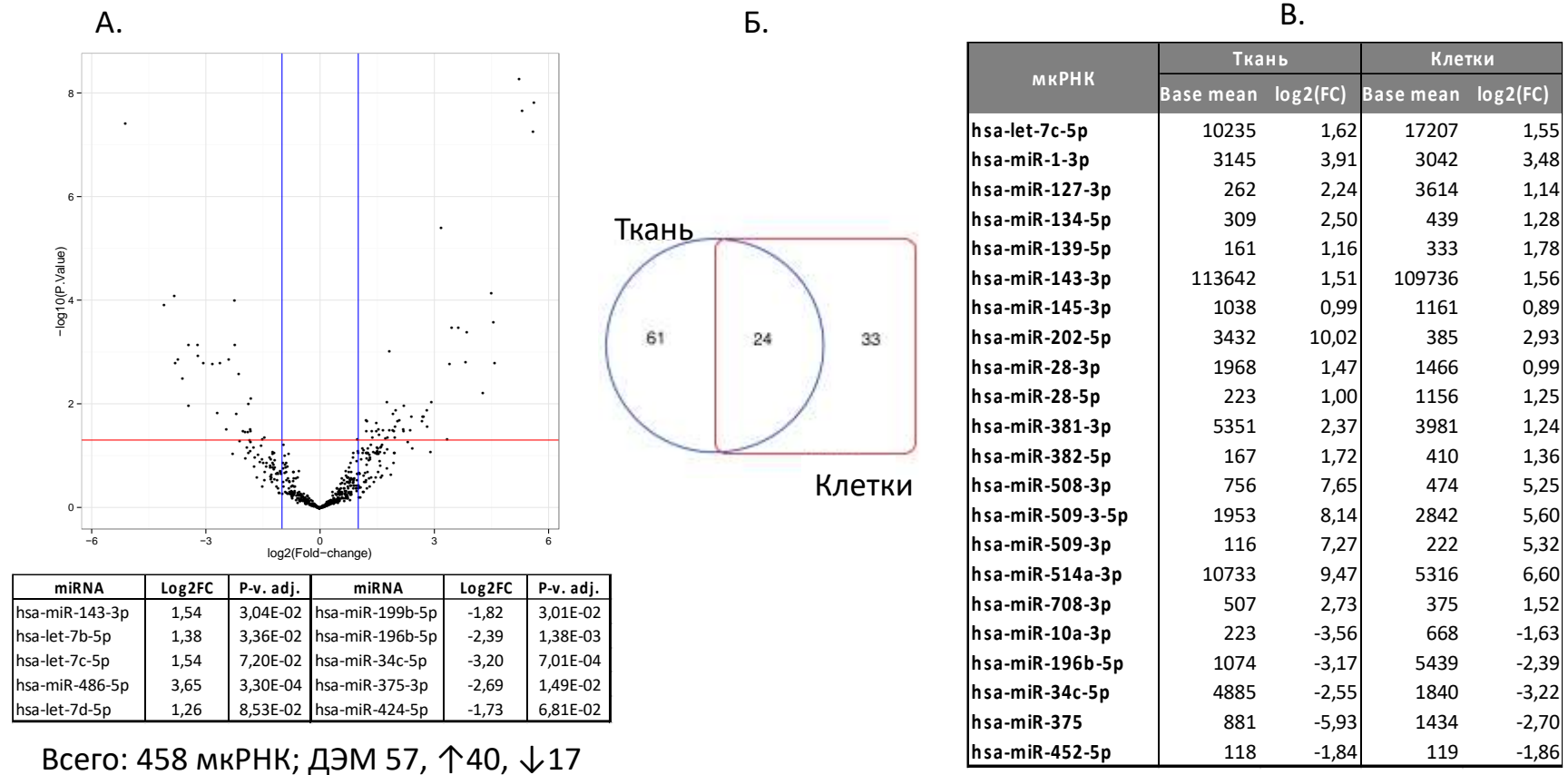
и 18 пониженную экспрессию в стромальных клетках эктопического эндометрия относительно клеток из эутопического эндометрия (Таблица 4А).

При сравнении списков мкРНК дифференциально экспрессирующихся в стромальных клетках и тканях эктопического эндометрия было выявлено 24 совпадающих ДЭМ (Таблица 4Б, 4В). Оставшиеся 33 ДЭМ из списка, полученного для стромальных клеток, также присутствовали в списках ДЭМ, полученных для ткани кисты, однако экспрессия этих мкРНК в тканях достоверно не изменялась. Полученные данные свидетельствуют о том, что при исследовании образцов тканей суммарное определение экспрессии может маскировать представленность и направление изменений мкРНК в индивидуальных клеточных популяциях.

Функциональный анализ генов-мишеней дифференциально экспрессированных микроРНК в клетках и тканях эндометрия

Для полученных в ходе исследования списков ДЭМ был произведен поиск потенциальных генов-мишеней в базе данных MirTarBase. мкРНК теоретически могут взаимодействовать с множеством мРНК, поэтому по результатам поиска отбирались только наиболее вероятные пары мкРНК-мРНК, взаимодействие которых установлено с высокой степенью валидации. Отобранные гены-мишени были использованы для обогащения по базе данных WikiPathways. На основании статистических параметров значимости и достоверности выбора наборов генов-мишеней для того или иного процесса и их представленности для каждой группы сравнения были отобраны пути, из которых были выделены списки наиболее представленных хотя бы в двух группах сравнения. Среди клеточных процессов и сигнальных каскадов особенного внимания заслуживают пути, запускаемые пролактином, тиреотропином, эстрогенами, факторами роста и морфогенными регуляторами. В результате обогащения также обнаружилась группа путей, ассоциированных с интерлейкинами (IL-1,-4,-5,-7,-9), которые могут участвовать в регуляции воспалительных процессов при формировании очагов эндометриоза. Также были установлены внутриклеточные процессы, участвующие в регуляции репарации ДНК при ее повреждении, где также обращает на себя внимание обогащение по регуляторным путям, реализующимся при участии мкРНК (miRNA

Таблица 4. Дифференциальная экспрессия мкРНК в стромальных клетках эндометриоидных кист яичника.



А. График распределение ДЭМ и список наиболее представленных ДЭМ в стромальных клетках

Б. Распределение общих и уникальных ДЭМ в стромальных клетках и тканях ЭКЯ

В. Таблица общих ДЭМ для стромальных клеток и тканей ЭКЯ

Log2FC – логарифм значения кратности изменения экспрессии по основанию 2; P-v.adj – значения p с поправкой на множественные сравнения; Basemean – среднее значение количества прочтений при секвенировании в группах сравнения

involved in DDR). Активация указанных путей, а также сигнализации, опосредованной интерлейкинами, EPO и TP53 свидетельствует о вкладе воспалительного процесса и окислительного стресса в развитие генетической нестабильности в клетках эктопического эндометрия. Проведенное обогащение по генам-мишеням ДЭМ в стромальных клетках при эндометриозе яичников выявило процессы и пути внутриклеточной сигнализации, сходные с описанными выше для тканей кисты.

В стромальных клетках среди клеточных процессов и сигнальных путей особенного внимания заслуживают пути, активируемые эстрогенами, фолликулостимулирующим гормоном, лептином, пролактином, тиреотропином и серотонином.

Были также определены клеточные процессы, связанные с канцерогенезом, ангиогенезом и дифференцировкой. Особого внимания также заслуживает обогащение по пути регуляции репарации ДНК с участием мкРНК. Активация данного пути (miRNAs involved in DDR) может свидетельствовать о повышении уровня повреждений ДНК в стромальных клетках вследствие развития воспаления и оксидативного стресса в эктопическом эндометрии, а также окружающих его тканях.

Полученные в результате биоинформатического анализа данные могут служить подтверждением существенной роли выявленных в ходе исследования ДЭМ в патогенетических механизмах развития наружного генитального эндометриоза.

Протеомный анализ белков стромальных клеток эктопического и эутопического эндометрия

С использованием методов масс-спектрометрической идентификации проведен протеомный анализ состава белков стромальных клеток, выделенных из эктопического и эутопического эндометрия. Выявлено 246 белков с достоверно отличающейся экспрессией в стромальных клетках из эктопического эндометрия. Обогащение путей и процессов с использованием дифференциально экспрессированных белков выявило пути, ассоциированные с окислительным стрессом, воспалением, митохондриальной функцией и регуляцией метаболизма.

Одними из значимых были пути с идентификаторами Proteasome Degradation и Keap1-Nrf2 Pathway, которые оказывают цитопротективное действие в условиях различных токсических воздействий, в частности в условиях окислительного стресса. Обогащение по данным путям подтверждает гипотезу о том, что в очагах эндометриоидных гетеротопий формируется провоспалительное окружение, характеризующееся развитием окислительного стресса, приводящего к повреждению белков и ДНК. Эти данные согласуются с результатами проведенных нами транскриптомных исследований, где было показано участие дифференциально экспрессированных мкРНК и их генов-мишеней в процессах репарации ДНК, что свидетельствует о генотоксическом действии патогенетических факторов при эндометриозе.

Среди дифференциально экспрессированных белков 18 оказались потенциальными мишенями ДЭМ, выявленными ранее в стромальных клетках. Функциональный анализ 18 белков, являющихся потенциальными мишенями 12 ДЭМ, показал кластеризацию на две взаимосвязанные группы. Первая группа включает 5 белков, кодируемых генами PTMA, HMGB1, NES, TFRC и CASP3, которые принимают участие в процессах выживания, репарации ДНК, пролиферации и воспаления. Вторая группа состоит из 6 генов FN1, CDC42, ARPC3, DPYSL2, RDX, YWHAZ, задействованных при адгезии, миграции, внутриклеточном транспорте и митозе. Вне кластеризации осталась группа из семи белков, которые по своему функциональному потенциалу способны участвовать в регуляции роста и развития, активности факторов транскрипции и ферментов, ответственных за деградацию белков.

В исследовании были использованы также образцы клеток, полученные от пациентов, у которых впоследствии обнаружился рецидив эндометриоидной кисты яичника. Сравнительный анализ образцов пациентов с рецидивом и без данного осложнения выявил четыре белка, экспрессия которых отличалась в стромальных клетках эктопического эндометрия, полученного от больных с рецидивом. Было выявлено два белка с пониженной экспрессией – статмин-1 и белок теплового шока A2, и два белка с повышенной экспрессией – кальпонин-1 и аннексин-A4. Таким образом, оценка изменения экспрессии данных белков в

тканях эктопического эндометрия может рассматриваться как потенциальный способ прогнозирования рецидива при эндометриоидных кистах яичников.

Дифференциальная экспрессия пРНК в тканях эндометрия

В результате секвенирования малых РНК из образцов тканей эндометрия пролиферативной фазы было установлено, что в эутопическом и эктопическом эндометрии идентифицируется 197 пРНК. Далее был проведен анализ ДЭП в эктопическом эндометрии относительно эутопического. Всего было выявлено 30 ДЭП, среди которых только 4 с повышенной и 26 с пониженной экспрессией. Проведен функциональный анализ выявленных ДЭП, согласно результатам которого показано участие генов-мишеней в сигнальных каскадах p53, Wnt, mTOR, JAK-STAT, которые вовлечены в регуляцию клеточного деления и метаболизма. С этими каскадами могут быть связаны выявленные пути, задействованные в метаболизме сахаров и азотистых оснований. Обращает также на себя внимание присутствие процессов, ассоциированных с различными новообразованиями. Таким образом, проведенный анализ позволил впервые верифицировать дифференциальную экспрессию пРНК в тканях эндометриоидных кист яичников и в эутопическом эндометрии.

В целом, на основе полученных результатов сформирован существенный задел для дальнейших исследований и детализации механизмов патогенеза эндометриоза. Полученные данные дали ценную информацию о путях внутриклеточной сигнализации и их компонентах, которые могут рассматриваться в качестве патогенетических маркеров и потенциальных терапевтических мишеней для лечения эндометриоза и его осложнений.

Выводы

1. К факторам риска развития наружного генитального эндометриоза у женщин репродуктивного возраста относится наличие преморбидного фона в виде воспалительных заболеваний в анамнезе, а также отягощенный семейный анамнез у 25% пациенток с эндометриоидными кистами яичников и 44% с ретроцервикальным эндометриозом. Для женщин с эндометриоидными кистами яичников и с ретроцервикальным эндометриозом характерны различия в клинической картине, тяжести течения заболевания и хирургическом лечении.

Наиболее частые жалобы пациенток с различными формами наружного генитального эндометриоза – боли внизу живота, болезненные менструации, диспареуния – схожи, но наиболее выражены при ретроцервикальном эндометриозе.

2. У пациенток с эндометриоидными кистами яичников частота первичного бесплодия достигает 51%, что значительно выше по сравнению с женщинами с ретроцервикальным эндометриозом – 22%. Частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, достоверно выше среди женщин, которые были прооперированы по поводу ретроцервикального эндометриоза – 17 (81%) пациенток из 21, в случае удаления эндометриоидных кист – 13 (42%) из 31.

3. Показано изменение экспрессии мкРНК в эктопическом и эутопическом эндометрии при эндометриоидных кистах яичников и ретроцервикальном эндометриозе в зависимости от локализации очага и фазы менструального цикла.

4. Выявлена повышенная экспрессия трех мкРНК: miR-143-3p, miR-106b-5p и miR-1-3p в эутопическом эндометрии больных эндометриозом, которые в перспективе могут быть использованы в качестве диагностических маркеров наружного генитального эндометриоза.

5. В стромальных клетках эктопического эндометрия пациенток с рецидивом эндометриоидных кист яичников выявлены белки: статмин-1, белок теплового шока A2, кальпонин-1 и аннексин-A4, которые могут рассматриваться в качестве потенциальных прогностических маркеров рецидивирования эндометриоза.

6. Впервые показана экспрессия пРНК в тканях эктопического и эутопического эндометрия. Биоинформационный анализ путей внутриклеточной сигнализации, регулируемых пРНК, указывает на то, что изменение их экспрессии может служить новым патогенетическим звеном при развитии эндометриоза.

Практические рекомендации

1. Пациенток с отягощенным семейным анамнезом по эндометриозу, а также с наличием воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе следует относить в группу риска по развитию наружного генитального эндометриоза. Это

позволит повысить эффективность профилактики, динамического наблюдения, диспансеризации с целью выявления эндометриоза до клинической манифестации и реализации репродуктивной функции с учетом высокого риска развития заболевания.

2. Исследование соскоба эндометрия для выявления мкРНК-106b-5p, -1-3p и -143-3p с помощью ПЦР в режиме реального времени целесообразно для неинвазивной диагностики эндометриоза на доклиническом этапе.

3. При хирургическом лечении эндометриоза пациенткам может быть рекомендовано проведение протеомного исследования тканей эктопического эндометрия для выявления белков-маркеров с целью прогнозирования риска рецидивирования, что позволит определить тактику ведения пациенток после операции и рекомендовать сроки реализации репродуктивной функции.

4. Внедрение нового алгоритма диагностики эндометриоза позволит выявить заболевание на ранней стадии, своевременно назначить лечение, и предотвратить возникновение рецидивов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Биомаркеры эндометриоза: проблемы и возможности ранней диагностики рецидивов заболевания (обзорная статья) / Н.А. Межлумова, М.Ю. Бобров, Л.В. Адамян // **Проблемы репродукции.** – 2018. – № 6. – С.139-148.

2. Профилирование микроРНК и мРНК в тканях эутопического и эктопического эндометрия при эндометриодных кистах яичников / Е.С. Филиппова, Н.А. Межлумова, А.М. Гамисония, Ч.М. Эльдаров, М. В. Кузнецова, Д.Ю. Трофимов, С.В. Павлович, И.Ф. Козаченко, М.Ю. Бобров, Л.В. Адамян // **Проблемы репродукции.** – 2019. – № 2. – С.27-45.

3. Анализ экспрессии микроРНК и мРНК в тканях эндометриодных кист яичников / Н.А. Межлумова, Е.С. Филиппова, И.Ф. Козаченко, М.Ю. Бобров, Л.В. Адамян // Тезисы XIV международного конгресса по репродуктивной медицине. – 2020. – С. 34-35.

4. Экспрессия PIWI-ассоциированных РНК в тканях эндометриодных кист яичника / Н.А. Межлумова, А.М. Гамисония, Ч.М. Эльдаров, И.З. Мамедов, Е.С. Филиппова, М.Ю. Бобров, Л.В. Адамян // **Проблемы репродукции.** – 2020. – № 3. – С.61-67.