На правах рукописи

Согоян Нелли Сережаевна

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКОВ РАЗВИТИЯ И РЕЦИДИВИРОВАНИЯ МИОМЫ МАТКИ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНО-ПЛАСТИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

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:

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН Адамян Лейла Вагоевна
кандидат биологических наук Кузнецова Мария Владимировна

Официальные оппоненты:

Доброхотова Юлия Эдуардовна - доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии, заведующая.

Тихомиров Александр Леонидович - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии.

Ведущая организация: ФГБНУ " Научно-исследовательский институт Акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О.Отта».

Защита состоится «15» декабря 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, 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/Sogoyan%20N.S.-disser_2.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь Калинина Елена Анатольевна
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лейомиома матки является одной из важнейших социально-значимых проблем женского здоровья, занимая первое место среди доброкачественных новообразований репродуктивной системы женщин. Частота данного заболевания варьирует от 50% в репродуктивном периоде до 70% - 80 % среди женщин в перименопаузе [Di Tommaso S. et.al, Selective genetic analysis of myoma pseudocapsule and potential biological impact on uterine fibroid medical therapy, Expert Opin.Ther. Targets. 2015; 19(1); 7-12; doi: 10.1517/14728222.2014.975793].

Этиопатогенетические механизмы развития лейомиомы до настоящего времени остаются недостаточно уточненными, несмотря на большое количество исследований в этой области. Доказано, что основными причинами развития миомы матки являются нарушения иммунной и нейроэндокринной систем, этническая принадлежность, отягощенность семейного анамнеза по данному заболеванию, наличие метаболического синдрома, стрессы, а также генетические нарушения [1.Chang CC et. al. Leiomyoma and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms: a systematic review. Taiwan J Obstet Gynecol 2010 Sep;49(3):247-53. doi: 10.1016/S1028-4559(10)60056-3, Taiwan. 2.Pavone, D. et.al., Epidemiology and risk factors of uterine fibroids. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 46, 3-11, Florence, Italy, (2018)].

Имеющиеся на сегодняшний день литературные данные свидетельствуют о вкладе наследственности в патогенез миомы матки, что подтверждается наличием «семейных форм» данного заболевания у 5-10 % больных, а также ассоциацией миомы матки с некоторыми наследственными заболеваниями, например, с синдромом Рида, а также с наследственной формой сосочкового почечно-клеточного рака [S. L. Skala, S. M. Dhanasekaran, and R. Mehra, “Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome (HLRCC): A Contemporary Review and Practical Discussion of the Differential

Diagnosis for HLRCC-Associated Renal Cell Carcinoma,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, no. 10, pp. 1202–1215, Oct. 2018, doi: 10.5858/arpa.2018-0216-RA].

В настоящее время миома матки уверенно занимает второе место в структуре гинекологических заболеваний, уступая место лишь воспалительным заболеваниям органов репродуктивной системы. Несмотря на доброкачественность процесса, симптоматика миомы матки достаточно многообразна: у 15-25% женщин наблюдаются симптомы лейомиомы различной степени тяжести, включая дисфункцию тазовых органов, аномальные маточные кровотечения, анемию, болевой синдром, бесплодие. По поводу симптомной миомы в России, по различным данным, производится до 50—70% операций в гинекологических стационарах, среди них до 370 тысяч гистерэктомий ежегодно [Адамян *Л.В.* Миома матки: диагностика, лечение и реабилитация. М.: ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России; 2015. 72с], что характеризует миому матки как одну из важнейших угроз репродуктивному здоровью женщин.

Вопрос рецидивирования ЛМ после проведения реконструктивно-пластических операций до сих пор остается дискутабельным. Международные источники литературы представляют крайне разнообразные сведения по этому поводу. Согласно им, частота рецидивов миомы матки после органосохраняющего хирургического лечения может достигать 90%, что обуславливает необходимость повторного оперативного вмешательства у 1,3-27% больных. При наличии множественных узлов риск рецидивирования выше и достигает 59%, что, возможно, связано с персистенцией патологического гиперпластического процесса, а риск повторных операций может достигать 26 %. При единичном узле рецидив миомы составляет 27%, риск повторного оперативного вмешательства по поводу рецидива заболевания - 11%.

Важную роль данной гинекологической патологии отводят и в структуре женского бесплодия. Миома матки является единственной причиной как

первичного, так и вторичного бесплодия в 23,5% случаев. Первичное бесплодие наблюдается почти у каждой 4-5-й больной с этим диагнозом, в связи с чем оптимизация ранней диагностики и прогнозирования рисков рецидивирования миомы с целью своевременного лечения и профилактики рецидивирования опухоли и, как следствие, сохранения матки в детородном возрасте как полноценного органа, способного к вынашиванию плода, до сих пор остается одним из самых наукоёмких и актуальных направлений в области репродуктивной медицины [Подзолкова Н.М. и др, Эффективность вспомогательных репродуктивных технологий при миоме матки. М.: ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России; 2015: 60-4].

Симптомы, связанные с ростом миомы, могут существенно ухудшать качество жизни женщины, снижать ее работоспособность, увеличивать частоту госпитализаций в гинекологические стационары в связи с тяжелыми кровотечениями, с развитием осложнений, необходимостью оперативного лечения и, в целом, увеличивать затраты государства на реабилитацию таких пациенток, что также определяет высокую социальную значимость данного заболевания.

В связи с вышесказанным, представляется актуальным поиск генетических маркеров для преклинической диагностики и прогнозирования рисков развития и рецидивирования миомы матки у женщин репродуктивного возраста.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы отмечается рост интереса к разработке современных методов диагностики гинекологических заболеваний. В практику здравоохранения внедрены генетические панели для диагностики рака молочной железы [S. M. Domchek e, 2010], преждевременной недостаточности яичников [C. Ciaccio, 2017], а также ряда других заболеваний, при этом до сих пор не обнаружены генетические маркеры наиболее социально-значимых гинекологических патологий, в том числе и миомы матки.

Несмотря на развитие молекулярно-генетических методов исследования, патогенез миомы матки остается одним из неизученных тем в области репродуктивной генетики. Наиболее значимым открытием в этой области оказалось описание соматических мутаций в экзоне 2 гена MED12, встраивание которых в геном мышей стимулирует у них развитие миомы матки [P. Mittal, 2015]. Однако данные мутации, в связи с соматической природой, не нашли широкого применения в практике. В качестве генетических маркеров развития миомы матки были предложены также варианты однонуклеотидных полиморфизмов в различных геномных локусах, ассоциированных с лейомиомой, однако специфичных для маркеров для миомы матки не было выявлено [C. S. Gallagher, 2018].

Несмотря на большое количество исследований в области генетических механизмов развития миомы матки до сих пор не выявлены маркеры для преклинической диагностики и прогнозирования рисков развития и рецидивирования данного заболевания, особенно с учетом клинико-анамнестических особенностей.

Цель исследования

Повышение эффективности прогнозирования риска развития и рецидивирования миомы матки после реконструктивно-пластических операций у пациенток репродуктивного возраста с использованием молекулярно-генетических маркеров.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинико-анамнестические особенности пациенток репродуктивного возраста с миомой матки и выявить частоту и клинические факторы риска рецидивирования.

2. Определить наличие/отсутствие соматических мутаций в экзоне 2 гена MED12 (статус гена MED 12) в миоматозных узлах пациенток, включенных в исследуемые группы.

3. Провести генотипирование образцов крови пациенток по 906600 однонуклеотидным полиморфизмам, выявить среди них варианты, связанные

с повышенным риском развития миомы матки и определить степень ассоциации данных полиморфизмов в выбранных генах, а также соматических мутаций в экзоне 2 гена MED 12 с отягощенным анамнезом по миоме матки и риском рецидивирования.

4. Изучить ближайшие и отдаленные результаты после лечения пациенток репродуктивного возраста с миомой матки с целью оценки течения послеоперационного периода, восстановления репродуктивной функции и развития рецидивов заболевания.

5. Оптимизировать тактику обследования и ведения (мониторинг, объем хирургического лечения и реабилитация) пациенток репродуктивного возраста с миомой матки на основании генетических и клинико-анамнестических данных и внедрить в практику здравоохранения алгоритмы ведения пациенток с миомой матки до и после реконструктивно-пластических операций.

Научная новизна

На основании проведенного исследования были выявлены клинико-анамнестические показатели, отражающие высокий риск развития и рецидивирования миомы матки, среди которых наиболее значимыми являются наследственная предрасположенность к развитию миомы матки, повышенный индекс массы тела, а также наличие множественных миоматозных узлов.

После реконструктивно-пластических операций по поводу миомы матки частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий выше у женщин без наследственной отягощенности по миоме матки.

На основании изучения молекулярно-генетических факторов развития миомы матки с учетом клинико-анамнестических параметров в образцах миоматозных узлов обнаружены соматические мутации в экзоне 2 гена MED12, в частности однонуклеотидная замена 131 G/A, ассоциированные с развитием «семейных» форм данного заболевания.

Полногеномное генотипирование и последующее изучение кандидатных полиморфизмов rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs176069 с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определило маркеры для прогнозирования рисков развития и рецидивирования миомы матки, а также протективные варианты однонуклеотидных полиморфизмов, наличие которых в геноме женщин свидетельствует о низком риске развития заболевания.

Практическая значимость

Подтвержден высокий риск развития миомы матки у женщин с наследственной предрасположенностью к развитию заболевания и выявлены клинико-анамнестические факторы высокого риска рецидивирования: «семейная» форма заболевания, повышенный индекс массы тела, наличие множественных миоматозных узлов, что имеет важное значение.

Изучение ближайших и отдаленных результатов лечения показало высокую эффективность реконструктивно-пластических операций при миоме матки, как для прогнозирования и профилактики возможных рецидивов, так и для выбора тактики лечения, что подтверждается высокой частотой наступления беременности, в том числе самопроизвольной и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, и низкой частотой развития рецидивов.

Генотипирование по полиморфизмам, связанным с высоким риском развития миомы матки, проведенное с учетом клинико-анамнестических особенностей, позволило оценить вероятность развития и рецидивирования данного заболевания у пациенток, прошедших хирургическое лечение в связи с наличием миомы матки, а также разработать индивидуальную программу восстановительного лечения.

В результате проведенного исследования предложены маркеры развития миомы матки, применение которых существенно повышает эффективность как диагностики с учетом клинико-анамнестиеских и генетических особенностей, так и лечения и реабилитации женщин с миомой матки.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наследственная отягощенность наряду с повышенным индексом массы тела и наличием множественных узлов является фактором риска рецидивирования миомы матки и ассоциируется с высокой частотой выявления бесплодия.

2. Соматические мутации в экзоне 2 гена MED 12 можно рассматривать в качестве генетических маркеров развития «семейных форм» миомы матки. Генотипирование по однонуклеотидным полиморфизмам, ассоциированным с развитием миомы матки, позволяет выделять минорные варианты аллелей, которые носят «протективный» характер, а также часто встречающиеся варианты, являющиеся маркерами высокого риска развития миомы матки.

3. При наследственной форме миомы матки вероятность раннего рецидивирования и частота повторных оперативных вмешательств выше, чем при отсутствии отягощенности анамнеза, однако частота наступления беременности после органосохраняющего оперативного вмешательства по поводу миомы матки, как самопроизвольной, так и в результате применения методов ВРТ, ниже.

4. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени может быть использован для быстрого и эффективного анализа однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с развитием миомы матки. Варианты однонуклеотидных полиморфизмов позволяют оценить риск развития и рецидивирования миомы матки у женщин репродуктивного возраста.

Личный вклад автора

В процессе выполнения данной работы автором осуществлено планирование научного исследования: формирование методологической структуры, формулировка целей и задач исследования, анализ медицинской документации, подбор пациенток, сбор биологического материала, обобщение и статистическая обработка полученных данных, публикация результатов исследования. Автор лично участвовал во всех этапах ведения пациенток:

обследовании, оперативном лечении, послеоперационном ведении и реабилитации. Автор непосредственно участвовал в анализе данных, полученных при молекулярно-генетическом исследовании биологического материала.

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 гинекологии.

Апробация работы

Апробация диссертации была проведена на межклинической конференции (3.07.20) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (17.08.20).

Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: XXIX Международный конгресс «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, Россия, 2016), The 17th World Congress Gynecological endocrinology (Италия, Рим, 2016), 46th AAGL Global Congress on Minimally Invasive Gynecology (Вашингтон, США, 2017), XX Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и дитя» (Москва, Россия, 2018), The 18th World Congress Gynecological endocrinology (Флоренция, Италия 2018), 47th AAGL Global Congress on Minimally Invasive Gynecology (Лас-Вегас, США, 2018), I Национальный конгресс «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, Россия, 2019), XXXI Международный конгресс «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, Россия, 2019), XXI Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и дитя» (Москва, Россия, 2019), 48th AAGL Global Congress on Minimally Invasive Gynecology (Ванкувер, Канада, 2019), Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте (Москва, Россия, 2019), XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине

(Москва, Россия, 2020), XXXII Международный конгресс «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, Россия, 2020).

Внедрение результатов работы в практику

Полученные научные и практические результаты внедрены в работу гинекологического отделения отдела оперативной гинекологии и общей хирургии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 5 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка используемой литературы. Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста, иллюстрирована 27 таблицами и 18 рисунками. Библиографический указатель включает 169 источников: 18 отечественных и 151 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведено молекулярно-генетическое исследование образцов миоматозных узлов и аликвот крови 305 женщин репродуктивного возраста с гистологически верифицированным диагнозом миома матки, поступивших в плановом порядке для хирургического лечения в гинекологическое отделение ФГБУ «НЦАГиП им.В.И. Кулакова» Минздрава России (зав. – академик РАН Л.В. Адамян) в период с 2016 по 2019 гг. Группу сравнения составили 40 женщин, находящихся в менопаузальном периоде, не имеющих миомы матки в анамнезе и наследственно не отягощенных по данному заболеванию.

Критериями включения женщин в исследование стали: репродуктивный возраст пациенток, миома матки, выявленная при оперативном вмешательстве и подтвержденная при последующем гистологическом исследовании. отсутствие беременности, а также наличие информированного согласия на

участие в исследовании. Критерии исключения: период постменопаузы, злокачественные новообразования репродуктивной системы, острые воспалительные заболевания органов малого таза, тяжелая сопутствующая экстрагенитальная патология, наличие заболеваний, являющихся противопоказанием для оперативного лечения.

Для решения поставленных задач исследование проводилось в несколько этапов. На первом этапе было проведено клиническое и инструментальное исследование с последующей лечебно-диагностической лапароскопией 305 пациенток с миомой матки. У пациенток исследуемой группы в качестве изучаемого материала были получены биологические образцы миоматозных узлов и аликвоты крови.

На первом этапе исследования образцы миоматозных узлов, полученных от 126 пациенток, были исследованы на наличие соматических мутаций в экзоне 2 гена MED 12 методом секвенирования по Сенгеру. Аликвоты крови пациенток исследуемой группы были также секвенированы с целью подтверждения соматической природы мутаций.

На втором этапе исследования 20 пациенткам с миомой матки, отягощенным анамнезом по данной патологии и наличием соматических мутаций в экзоне 2 гена MED 12 и 14 пациенткам группы сравнения был проведен микроматричный анализ на чипах SNP 6.0 (Affymetrix, США), позволивший провести генотипирование образцов по 906600 однонуклеотидным полиморфизмам (rs), распределенным по всему геному, позволивший выявить наиболее значимые из них при помощи статистического анализа.

Третий этап исследования включал генотипирование 215 пациенток исследуемой группы и 40 пациенток группы сравнения с использованием метода ПЦР в реальном времени по выбранным значимым однонуклеотидным полиморфизмам с дальнейшим статистическим анализом вариантов их аллелей.

Гистологическая верификация диагноза и исследование удаленных препаратов на наличие фрагментов псевдокапсулы миоматозного узла или миометрия проводили по общепринятой методике в 1-ом патологоанатомическом отделении ФГБУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (зав. – проф. А.И. Щеголев).

Молекулярно-генетические исследование образцов тканей и крови проводили в отделении молекулярно-генетических методов исследования Института Репродуктивной генетики (зав. – проф. Д.Ю.Трофимов). Статистический анализ полученных результатов был проведен с помощью программ Statistica 9 и IBM SPSS Statistics 22. Для оценки характера распределения количественных данных предварительно проводился тест Шапиро-Уилка W. Достоверность различий в частоте встречаемости качественных признаков определяли по критерию χ^2 с поправкой на правдоподобие.

Результаты исследований и их обсуждение

Доля пациенток с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки составила 46% (141), без отягощенного анамнеза – 39 % (119), 3 группу, в которую вошли женщины, не имеющие точной информации о семейном анамнезе, составили 15% (45). Пациентки с рецидивами миомы матки были включены в соответствующие подгруппы: 58 (41 %) женщин в подгруппе Ia, 32 (27%) – в подгруппе IIa и 14 (31) % в подгруппе IIIa (p=0.017), что свидетельствует об ассоциации анамнестических данных с риском рецидивирования миомы матки (рисунок 1). Более трети пациенток с рецидивами обращались за повторным оперативным вмешательством по поводу данного заболевания (36%).

Все пациентки находились в репродуктивном возрасте (18-50), средний возраст во всех трех группах составил 38.54 ± 6.79. При анализе возрастного показателя выяснилось, что в подгруппы с рецидивами вошли женщины позднего репродуктивного возраста, старше 38 лет (p=0.02).

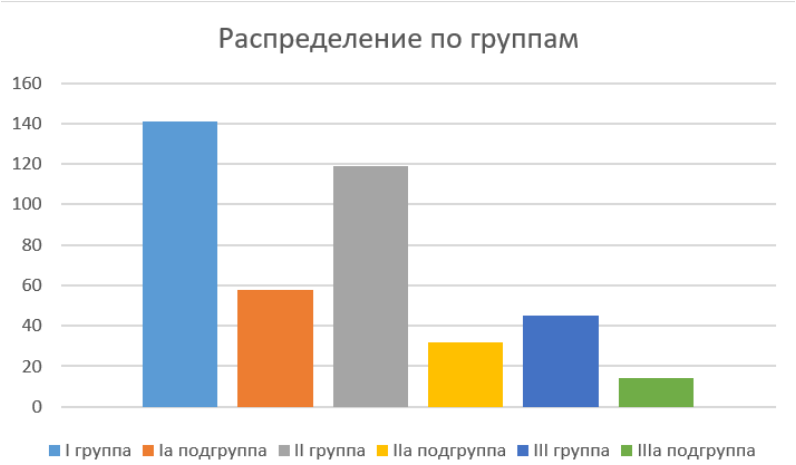


Рисунок 1. Распределение пациенток по группам исследования

При анализе антропометрических данных не было выявлено существенных отличий в показателях. Однако анализ ИМТ выявил достоверные различия при сравнении основных групп исследования с подгруппами рецидива миомы матки: Ia –31 (53 %), p=0.004; IIa – 21 (67%), p=0.017 и IIIa – 11 (80 %), p=0.016 (таблица 1).

Таблица 1

Сравнение показателей ИМТ в подгруппах с рецидивами и генеральных совокупностях

	Количество женщин с повышенным ИМТ	p - уровень χ^2-тест	
Группа I	37 (26%)	p=0.004	p=0.31 p=0.51 p=0.95
Ia	31 (53 %)		
Группа II	38 (32 %)	p=0.017	
IIa	21 (67 %)		
Группа III	12 (27 %)	p=0.016	
IIIa	11 (80 %)		

При оценке менструальной функции, акушерского анамнеза, сопутствующей экстрагенитальной и гинекологической патологии достоверных различий в сравниваемых группах не было выявлено.

Среди жалоб, предъявляемых пациентками при госпитализации, чаще всего отмечались обильные менструации: 69 (49%) пациенток I группы, 57 (48%) – II и 32 (71%) – III групп (p=0.041), а также болевой синдром (тянущие боли внизу живота): в I группе у 59 (42%) женщин, во II группе на данный симптом жаловались 42 (35%) пациентки, а в III группе – 27 (60%) женщин, p=0.017.

Статистически значимого отличия в показателях описанных выше симптомов в подгруппах и генеральных выборках выявлено не было. Однако в подгруппе Iа (у женщин с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки и наличием рецидива данного заболевания) бесплодие было выявлено у 34 (60%) пациенток, что достоверно отличает данную подгруппу от I группы, в которой бесплодие отмечали 26 (18%) пациенток, p=0.012, всего с бесплодием было 111 пациенток, из них первичное бесплодие – у 67 (23%), вторичное бесплодие – у 33 (11%) пациенток.

С целью определения количества миоматозных узлов, их размеров и локализации, а также выявления сопутствующих гинекологических заболеваний всем пациенткам было проведено ультразвуковое исследование органов малого таза. При необходимости пациенткам проводили магнитно-резонансную томографию.

При проведение ультразвукового исследования у 73 пациенток была выявлена сопутствующая патология, локализованная в малом тазу. Гиперплазию эндометрия выявили у 49 (16%) женщин с миомой матки, полипы эндометрия и цервикального канала – у 61 (20 %) пациенток, аденомиоз – у 37 (12 %) женщин.

Ультразвуковое исследование позволило провести оценку миоматозных узлов: определить их количество и размеры. Согласно данным УЗИ у 105 (74,5%) пациенток I группы (54 (93%) пациенток Iа подгруппы), 62 (52%)

пациенток II группы (из них 29 (92%) женщин с рецидивами миомы матки), а также у 7 (53%) III группы и 14 (100%) женщин подгруппы IIIа была выявлена множественная миома матки, p=0,04. Наибольшее количество узлов наблюдалось в группе женщин с отягощенным семейным анамнезом и наличием рецидивов, до 22 узлов у одной пациентки (p<0,01). При анализе размеров миоматозных узлов статистически достоверной разницы между исследуемыми группами выявлено не было (p=0.96).

При хирургическом лечении предпочтение отдавалось миомэктомии лапароскопическим доступом, так доля лапароскопии в группах I, II и III составила 87%, 86,5% и 84 %. Методом лапаротомии было проведено 7 % операций в I группе, 9 % - во II группе и 16 % в группе III. Гистерорезектоскопии были сделаны у 23 (16%) пациенток I группы, 12 (11%) пациенток II группы и 6 (13%) пациенток III группы (p=0.352). Доля оперативных вмешательств в объеме миомэктомии составила 91 %, 93% и 87 %, гистерэктомии – 9%, 7% и 17 % в группах I, II и III соответственно (p=0,405). Также не было выявлено статистически достоверного различия в доступе и объеме оперативных вмешательств при сравнении данных показателей в основных исследуемых группах и подгруппах с рецидивами миомы матки.

Интраоперационно проводилась оценка размеров матки, количества и локализации миоматозных узлов, степень их дегенеративно-дистрофических изменений, состояние тканей матки, объем кровопотери.

Интраоперационно в большинстве случаев была обнаружена множественная миома матки: у 112 (79%) у женщин с отягощенным анамнезом, у 56 (97%) женщин в подгруппе с рецидивами (p=0,025), у 77 (65%) в группе без отягощенного анамнеза по миоме матки, у 29 (92%) в подгруппе IIа (p=0,059), у 24 (53%) и 14 (100%) женщин в III и IIIа группах, соответственно (p=0,045).

При анализе данных о продолжительности оперативных вмешательств статистически значимых отличий в группах сравнения выявлено не было. Так,

среднее время операции в группе I составило 129,5±54,2 мин., в группе II - 114,0±34,6 мин., в группе III -124,5±57,9 мин., p>0,05. Объем кровопотери зависел от количества и размеров миоматозных узлов, в среднем составил 348,6 ± 88,3 мл, в ряде случаев была использована реинфузия (15 (5%) пациенткам). Все операции были проведены без интраоперационных осложнений, диагноз был верифицирован гистологически во всех случаях.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Всем пациенткам проводилась антибиотикопрофилактика до 3-5х послеоперационных суток, профилактика тромбоэмболических осложнений, ранняя физиотерапия. Выписка из стационара проводилась на 5-7 сутки послеоперационного периода. Пациенткам, заинтересованным в реализации репродуктивного потенциала, было рекомендовано планирование беременности не ранее чем через 6 месяцев после хирургического лечения, в случае миомэктомии со вскрытием полости матки – через 9-12 месяцев. Контрольный осмотр с ультразвуковым исследованием назначен через 1 месяц. Все женщины находились под динамическим наблюдением в течение 12 месяцев.

Ближайшие и отдаленные результаты после проведенного лечения оценивались в течение 1 года, с контрольным осмотром и проведением УЗИ через 1, 6 и 12 месяцев. Обращали особое внимание на качество жизни женщин, жалобы, наличие рецидивов и восстановление репродуктивной функции, пациентки с бесплодием находились под наблюдением в течение 3 лет.

УЗИ позволило провести динамическое наблюдение и обнаружить возникновение рецидивов миомы матки (таблица 2). Рецидивы после реконструктивно-пластических операций выявлены у 67 (22%) пациенток, следует отметить, что ряд больных обращался за повторным оперативным вмешательством в отделение оперативной гинекологии Центра.

Таблица 2

Сроки возникновения рецидивов у пациенток исследуемых групп

	По данным УЗИ			Повторное оперативное вмешательство
	через 1 мес.	через 6 мес.	через 12 мес.	
Подгруппа Iа	6 (10%)	19(33%)	26 (45%)	17 (29%)
Подгруппа IIа	4 (13%)	3 (9%)	19 (59%)	3 (9%)
Подгруппа IIIа	1 (7%)	2 (14%)	10 (71%)	1 (7%)
Уровень значимости р	р=0.935	р=0.014	р=0.187	р=0.030

У женщин с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки (подгруппа Iа) рецидив ЛМ по данным УЗИ возникает достоверное чаще, в первые 6 месяцев, после ранее проведенного хирургического лечения по сравнению с подгруппами IIа и IIIа (р=0,014). При этом доля повторных оперативных вмешательств среди женщин данной подгруппы также достоверно выше 17 (29%) против 3 (9%) и 1 (7%) в исследуемых подгруппах (р=0,030), что может свидетельствовать о высоком риске раннего рецидивирования и необходимости повторного хирургического лечения миомы матки у женщин с наследственной отягощенностью по данному заболеванию.

В течение 1-3 лет после проведенного хирургического лечения женщины с бесплодием находились под наблюдением для оценки сроков и методов реализации репродуктивной функции (таблица 3). Беременность наступила у 52% женщин с бесплодием, обратившихся за оперативным лечением, при этом у 15 % были выявлены мужской, трубно-перитонеальный

и др. факторы бесплодия. В среднем беременность наступала через 12-13 месяцев (контрацепция продолжалась в течение 9 месяцев в среднем).

Таблица 3

Результаты реализации репродуктивной функции у женщин с бесплодием в исследуемых группах

	Самопроизвольно наступившая беременность	Беременность, наступившая в результате применения методов ВРТ
I группа, n=55	12 (22%)	3 (5%)
Iа подгруппа, n=38	7 (18%)	2 (5%)
II группа, n=42	24 (57%)	8 (19%)
IIа подгруппа, n=10	4 (40%)	0
III группа, n=14	9 (62%)	2 (14%)
IIIа подгруппа, n=4	3 (75%)	0

Анализ способов реализации репродуктивной функции позволил выявить большую частоту спонтанных беременностей по сравнению с наступившими в результате применения методов ВРТ: 12 (22%) и 3 (5%) в группе I (p=0.004), 7 (18%) и 2 (5 %) в подгруппе Iа (p=0,076), 24 (57%) и 8 (19%) в группе II (p=0.123), 4 (40%) против 0 в подгруппе IIа, 9 (62%) и 2 (14%) в группе III (p<0,001), в подгруппе IIIа – 3 (75%) против 0 (p=0.029). Данные результаты свидетельствуют о высокой вероятности наступления самопроизвольной беременности после реконструктивно-пластических операций по поводу миомы матки у женщин с бесплодием.

При сравнении групп пациенток в зависимости от отягощенности анамнеза по ЛМ было выявлено, что вероятность наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате ВРТ, выше у женщин, не имеющих наследственной отягощенности: 12 (22%) и 24 (57%) в I и II группах, соответственно, p<0,001 в случае наступления беременности естественным

путем, 3 (5%) и 8 (19%) – частота наступления беременности в результате применения методов ВРТ в I и II группах соответственно, p=0.037.

В большинстве случаев объем и доступ оперативного вмешательства определяются в зависимости от количества, размеров и расположения миоматозных узлов, в связи с чем крайне актуальным на сегодняшний день остается ранняя, преклиническая, диагностика миомы матки, которая позволит прогнозировать риск развития данного заболевания и не допустить роста миоматозных узлов до больших и гигантских размеров, препятствующих наступлению беременности, вынашиванию и рождению здорового ребенка.

Тактика ведения пациенток, как определение объема и доступа хирургического лечения, так и реабилитация, ведение в послеоперационном периоде и реализация репродуктивной функции во многом зависят от риска рецидивирования миомы матки, что определяет необходимость прогнозирования риска рецидивирования. Однако несмотря на активное развитие молекулярно-генетических методов исследования, до сих пор в арсенале практикующих врачей не имеется диагностических панелей, позволяющих выявить ЛМ до появления симптомов и возможности визуализации миоматозных узлов с помощью ультразвукового исследования, а также методов прогнозирования риска рецидивирования.

За последние десятилетия были совершены значительные открытия в области изучения генетических механизмов развития миомы матки. Наиболее существенный вклад в данной области внесла работа, посвященная изучению соматических мутаций в гене MED 12 [Mittal P, 2015]. Данное исследование позволило выявить соматические мутации, которые, согласно литературным данным, ведут к развитию миомы матки. Однако их использование в качестве маркеров ограничено в связи с соматической природой мутаций. С целью определения роли наследственной компоненты в риске возникновения соматических мутаций в миоматозных узлах нами было произведено полногеномное генотипирование женщин с нарушениями в гене MED 12.

Молекулярно-генетическое исследование миоматозных узлов и образцов крови пациенток из групп сравнения происходило в 3 этапа. На первом этапе были изучены соматические мутации в экзоне 2 гена MED 12 и определена взаимосвязь этих мутаций с отягощенностью семейного анамнеза пациенток по миоме матки. На втором этапе исследования в результате полногеномного генотипирования были отобраны кандидатные однонуклеотидные полиморфизмы и на третьем этапе на большой выборке произведена оценка встречаемости вариантов их аллелей в группах сравнения.

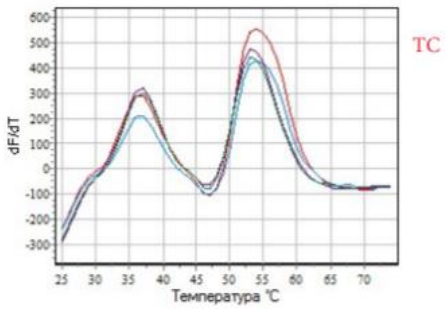
При сравнении групп по наличию мутаций в экзоне 2 гена MED 12 было обнаружено, что данные мутации чаще выявляются среди женщин с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки (38 (67%)), чем в группе женщин без отягощенного анамнеза (19 (42%)), p=0,012. При этом в группе III (группа сравнения), в которую вошли женщины, не имеющие точной информации по поводу семейного анамнеза, число MED12 + женщин составила 15 (62%), что подтверждает высокую распространенность данных мутаций в общей популяции, независимо от отягощенности анамнеза (p=0,04). В подгруппах с рецидивами достоверного различия выявлено не было.

В случае сравнения статуса миоматозных узлов была также обнаружена статистически достоверная разница между группами в зависимости от отягощенности анамнеза. Таким образом, доля узлов с соматическими мутациями в гене MED12 по группам распределилась следующим образом: группа I – 90 (60%), подгруппа Ia – 39 (76,5%), p=0,031; группа II – 39 (34%), подгруппа IIa- 9 (37,5%), p=0,737; группа III – 24 (43%), подгруппа IIIa – 5 (50%), p = 0,676. Статистически достоверной оказалось как отличие частоты встречаемости MED12+ миоматозных узлов в подгруппе Ia от генеральной совокупности (I группы), p=0,031, так и различие между генеральными совокупностями (p<0,001).

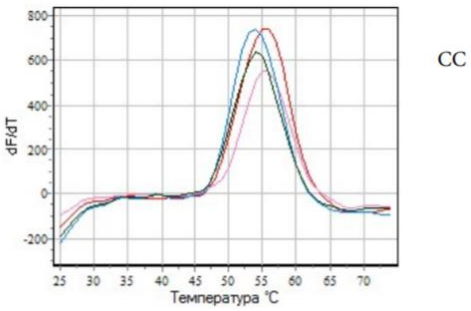
В результате полногеномного генотипироования по 906600 однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) 20 пациенток с отягощенным семейным анамнезом и наличием соматических мутаций в гене MED12 и 14

пациенток контрольной группы, не имеющих миомы матки в анамнезе и отягощенного анамнеза по данному заболеванию, было выделено 6 полиморфизмов rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs176069, локализованных в генах ESR1, FBN2, CELF4, KCWMB2, частоты которых статистически отличались в группах сравнения. Дальнейший их анализ на большой выборке пациенток позволил найти варианты аллелей, которые могут быть использованы в качестве маркеров высокого риска развития ЛМ, а также «протективные» варианты, обнаруживаемые у пациенток менопаузального периода, не имеющих в анамнезе миомы матки и отягощенного семейного анамнеза по данному заболеванию.

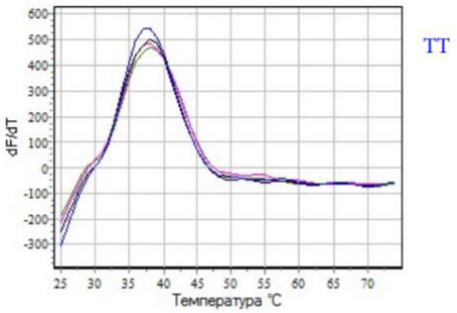
С использованием ПЦР в режиме реального времени был проведен анализ вариантов аллелей в изучаемых однонуклеотидных полиморфизмах с дальнейшей статистической оценкой их распространенности в исследуемых группах (рисунок 2).



а) Вариант TC



б) Вариант CC



в) Вариант TT

Рисунок 2. Изображение вариантов аллелей полиморфизма rs3020434, полученных в результате ПЦР в режиме реального времени.

Распределение вариантов аллелей для каждого однонуклеотидного полиморфизма представлено в таблице 4.

Таблица 4

Распределение вариантов аллелей изучаемых полиморфизмов в группах исследования

	Варианты аллелей	Вся популяция n=255	Группа контроля n=40	Пациенты с миомой матки, n=215	I группа n=98	II группа n=87	III группа n=30	Уровень значимости p
rs3020434	CC	148 (58%)	18 (45%)	130 (60%)	63 (64,3%)	51 (59%)	16 (53%)	p=0,037
	CT	51 (20%)	18 (45%)	33 (15%)	13 (13,2%)	10 (11%)	10 (33%)	p<0,001
	TT	56 (22%)	4 (10%)	52 (21%)	22 (22,5%)	26 (30%)	4 (13,4%)	p=0.250
rs11742635	GG	178 (70%)	25 (62.5%)	153 (71%)	71 (72%)	63 (72%)	19 (63%)	p=0.274
	GT	59 (23%)	7 (17.5%)	52 (24%)	23 (23%)	21 (24%)	8 (27%)	p=0.358
	TT	18 (7%)	8 (20%)	10 (5%)	4 (4%)	3 (4%)	3 (10 %)	p<0,001
rs124577644	AA	27 (10%)	9 (22,5%)	18 (8%)	4 (4%)	8 (9%)	6 (20%)	p=0.008
	AG	47 (18%)	14 (35%)	33 (15%)	18 (18%)	8 (9%)	7 (23%)	p=0.004
	GG	181 (71%)	17 (42,5%)	164 (76%)	76 (78%)	71 (81%)	17 (57%)	p<0,001
rs12637801	AA	15 (6%)	8 (20%)	7 (3%)	2 (2%)	1 (1%)	2 (6%)	p<0,001
	AC	55 (22%)	12 (30%)	43 (20%)	19 (19%)	21 (24%)	5 (17%)	p=0.158
	CC	185 (72%)	20 (50%)	165 (77%)	77 (79%)	65 (75%)	23 (77%)	p<0,001
rs2861221	CC	166 (65%)	18 (45%)	148 (69%)	73 (77%)	56 (64%)	19 (63%)	p=0.003
	CG	68 (27%)	12 (30%)	56 (26%)	23 (23%)	28 (32%)	5 (17%)	p=0.476
	GG	21 (8%)	10 (25%)	11 (5%)	2 (2%)	3 (3,4%)	6 (20%)	p<0,001
rs17677069	AA	193 (75,5%)	22 (54%)	171 (79,5%)	80 (82%)	64 (74%)	27 (90%)	p<0,001
	AG	55 (21,5%)	13 (33%)	42 (19,5%)	18 (18 %)	22 (25%)	2 (7%)	0.079
	GG	7 (3%)	5 (13%)	2 (1%)	0 (0%)	1 (1%)	1 (3%)	p<0,001

Таким образом, на основании полученных в результате исследования данных, можно предложить ряд маркеров, которые могут свидетельствовать о высоком риске развития миомы матки. Среди них гомозиготоный вариант CC

для однонуклеотидного полиморфизма rs3020434, гомозиготный вариант GG для rs124577644, вариант CC для полиморфизма rs12637801, а также вариант AA для однонуклеотидного полиморфизма rs17677069.

При оценке rs2861221 был обнаружен вариант аллеля, который может быть использован не только с целью прогнозирования риска развития миомы матки, но и определения высокого риска развития наследственной («семейной») формы данного заболевания. Таким маркером может служить гомозиготный вариант CC полиморфизма rs2861221.

Были также выделены варианты, которые с большой долей вероятности могут являться «протективными». Обнаружение этих вариантов свидетельствует о низком риске или отсутствии риска развития миомы матки. Среди них TT аллель полиморфизма rs11742635, AG и AA варианты rs124577644, гомозиготный вариант минорного аллеля AA для rs12637801, а также гомозиготные варианты для полиморфизмов *rs2861221 и* rs17677069.

Несмотря на наличие большого количества данных в источниках литературы о роли генетических нарушений в патогенезе миомы матки, до сих пор не существует специфических маркеров для преклинической диагностики, прогнозирования риска развития и рецидивирования данного заболевания.

Выводы

1. Риск развития миомы матки выше в 2 раза у женщин с наследственной предрасположенностью к развитию данного заболевания (46%). Факторами риска рецидивирования являются: повышенный индекс массы тела наличие множественной миомы матки, а также семейная форма миомы матки, при этом высока вероятность развития бесплодия среди пациенток, имеющих наследственную предрасположенность и рецидив миомы матки в анамнезе (60% женщин, p=0,012).

2. Наличие большого разнообразия однонуклеотидных замен и делеций в миоматозных узлах, полученных от женщин с отягощенным анамнезом, свидетельствует о влиянии наследственной компоненты на частоту возникновения и разнообразие соматических мутаций в экзоне 2 гена

MED 12. Наличие мутаций в гене MED12 (p=0,031) является фактором риска рецидивирования миом матки.

3. Имеется выраженная ассоциация между наличием мутаций в гене MED 12 с риском развития множественной миомы матки, при этом наличие разных мутаций в разных узлах подтверждает моноклональную природу опухоли.

4. В результате генотипирования по однонуклеотидным полиморфизмам выявлено, что часто встречающиеся варианты однонуклеотидных полиморфизмов rs3020434, rs124577644, rs12637801, rs17677069 и rs2861221 являются маркерами заболевания и могут быть использованы для прогнозирования риска развития миомы матки. «Минорные» варианты аллелей изученных полиморфизмов могут представлять собой «протективные» варианты и свидетельствовать о низком риске или отсутствии риска развития миомы матки.

5. Рецидив миомы матки в первые 6 месяцев после проведенного хирургического лечения чаще возникает у женщин с наследственной формой заболевания, при этом у них достоверно чаще возникает необходимость повторного хирургического лечения в связи с ростом миоматозных узлов и клинической манифестацией, а частота наступления беременности, как самопроизвольной, так и в результате применения методов вспомогательных репродуктивных технологий, ниже по сравнению с женщинами, не имеющими наследственной предрасположенности к развитию миомы матки.

6. На основании клинико-анамнестических показателей и наличия в геноме маркеров, ассоциированных с высоким риском развития и рецидивирования миомы матки, разработан алгоритм по тактике ведения пациенток с данным заболеванием, включающей хирургическое лечение и послеоперационную реабилитацию.

Практические рекомендации

1. При выявлении отягощенного семейного анамнеза по миоме матки: наличии данного заболевания у родственниц по материнской линии,

относящихся к первой линии родства (бабушка, мама, тетя, сестра, дочь) – необходимо информировать женщин о высоком риске развития у них данного заболевания, что позволит повысить внимание к профилактике, динамическому наблюдению, диспансеризации с целью выявления миомы матки до клинической манифестации и реализации репродуктивной функции с учетом высокого риска развития заболевания.

2. Пациенткам репродуктивного возраста необходимо проведение тщательного сбора анамнеза с выявлением факторов риска рецидивирования перед хирургическим лечением для определения тактики ведения пациенток до операции, объема и доступа оперативного вмешательства, а также послеоперационного восстановления пациенток.

3. При проведении хирургического лечения миомы матки пациенткам может быть рекомендовано проведение генетического исследования миоматозных узлов на наличие соматических мутаций в экзоне 2 гена MED 12 с целью обнаружения маркеров рецидивирования заболевания.

4. Пациенткам с наследственной предрасположенностью к развитию миомы матки может быть рекомендовано проведение ПЦР в режиме реального времени для выявления генетических маркеров с целью прогнозирования риска развития заболевания и его рецидивирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

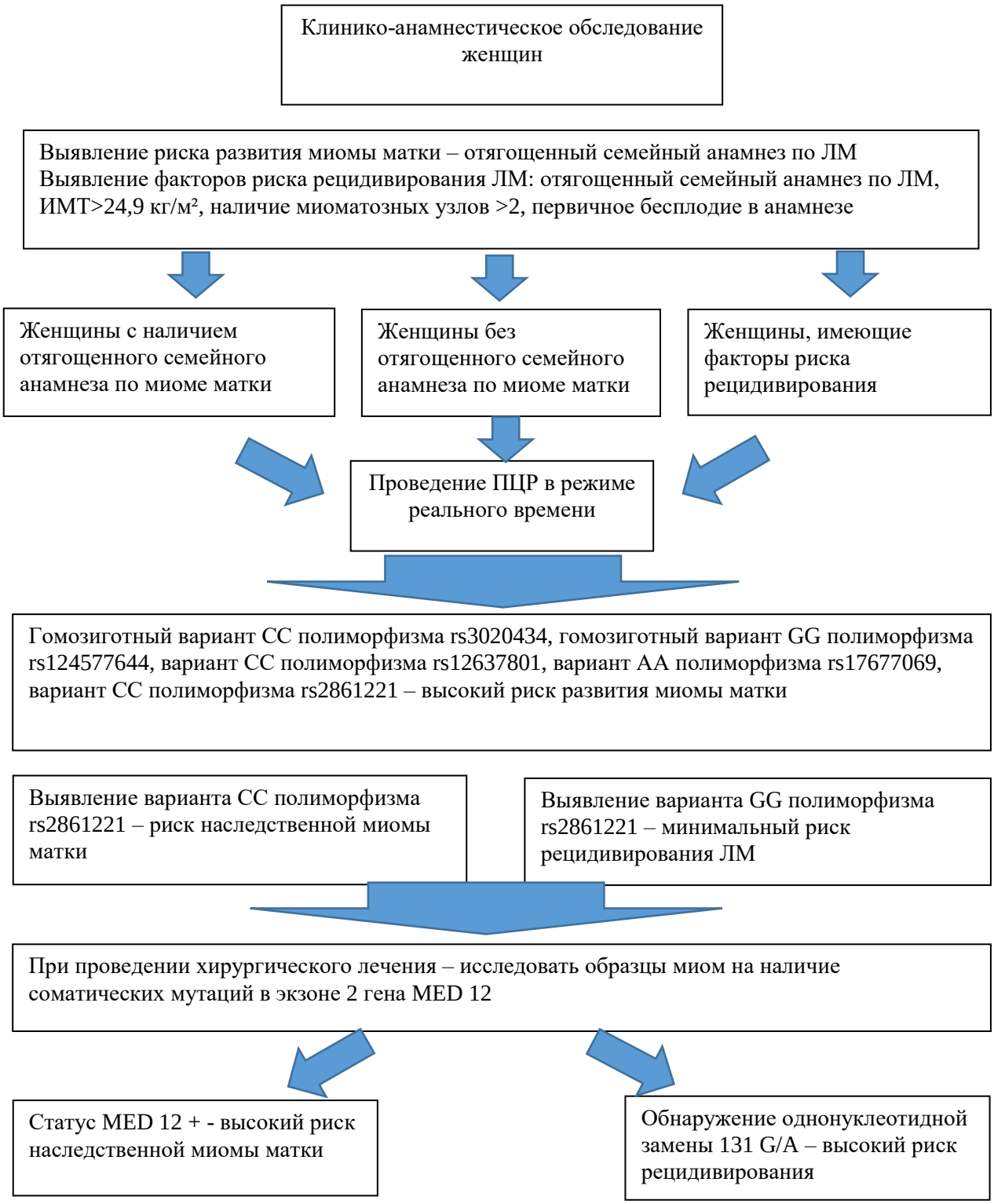
1. Генетические механизмы развития миомы матки/ Н.С. Согоян, Л.В. Адамян // Проблемы репродукции. - 2016. - №1 – С. 28-34.
2. Молекулярные механизмы патогенеза миомы матки: анализ мутаций в гене MED12 в российской популяции / Н.С.Согоян, М.В. Кузнецова, Д.Ю. Трофимов, Е.Ю. Тихончук, Л.В. Адамян, Г.Т.Сухих // Акушерство и гинекология. - 2016. -№ 10 – С. – 87-95.
3. Молекулярные механизмы патогенеза миомы матки: анализ мутаций в гене MED12 у женщин с отягощенным анамнезом/ Н.С.Согоян, М.В. Кузнецова, Д.Ю. Трофимов, Л.В. Адамян // Сборник тезисов

XXIX Международного конгресса «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» - 2016.

4. Somatic mutations in gene Med12 among women with the family history of uterine fibroids / N S Sogoyan, M V Kuznetsova, D Yu Trofimov, L V Adamyan, A A Stepanian // The journal of Minimally invasive gynecology.- 2017 – C – 39.
5. Somatic MED12 gene mutations in wome with burdened anamnesis/ N S Sogoyan, M V Kuznetsova, A V Asaturova, D Yu Trofimov, L V Adamyan // Abstracts of The 17 World Congress The Academy of Human reproduction (2018).
6. Соматические мутации в экзоне 2 гена MED12 у женщин с одиночной и множественной миомой матки / Н.С. Согоян, М.В. Кузнецова, Д.Ю. Трофимов, А.В. Асатурова, Л.В. Адамян // Акушерство и гинекология.-2018.-№12 – С. – 63-70.
7. Somatic MED12 gene mutations among women with the family history of uterine fibroids / N S Sogoyan, MV Kuznetsova, VO Dementueva, DYu Trofimov, LV Adamyan // Abstracts of The 18 World Congress of Gynecology Endocrinology.-2018.
8. Somatic MED12 gene mutations among women with multiple and single uterine fibroids / N S Sogoyan, M V Kuznetsova, D Yu Trofimov, L V Adamyan, A A Stepanian // The journal of Minimally invasive gynecology.-2018/
9. Соматические мутации в экзоне 2 гена MED12 у женщин с множественной и одиночной миомой матки / Н.С. Согоян, М.В. Кузнецова, Д.Ю. Трофимов, Л.В. Адамян // Сборник тезисов XX Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и дитя».-2018.
10. Исследование полиморфизмов rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs17677069 у женщин с миомой матки и отягощенным анамнезом / Н.С.Согоян, М.В.Кузнецова, Е.А.

Лоломадзе, Г.В.Михайловская, Н.Д. Мишина, Д.Ю. Трофимов, Л.В. Адамян // Акушерство и гинекология. - 2019.-№10.

11. The study of polymorphisms rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs17677069 in women with uterine leiomyomas and a family history of the disease / N S Sogoyan, M V Kuznetsova, D Yu Trofimov, L V Adamyan, A A Stepanian // The journal of Minimally invasive gynecology.-2018.
12. Наследственные факторы риска развития миомы матки: поиск маркерных однонуклеотидных полиморфизмов / Н.С. Согоян, К. А. Свирепова, М. В. Кузнецова, Д. В. Зеленский, Е. А. Лоломадзе, Г.В.Михайловская, Н. Д. Мишина, А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов// Вестник РГМУ.-2020.-№1

Приложение 1

Алгоритм обследования пациенток репродуктивного возраста с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки