

*На правах рукописи*

ТОНОЯН

Нарине Марзпетуновна

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РЕЦИДИВА МИОМЫ МАТКИ У БОЛЬНЫХ  
РЕПРОДУКТИВНОГО ПЕРИОДА ПУТЕМ МЕТАБОЛОМНОГО  
ПРОФИЛИРОВАНИЯ МЕТОДОМ МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИИ

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:

кандидат медицинских наук

Козаченко Ирена Феликсовна

кандидат физико-математических наук

Франкевич Владимир Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Беженарь Виталий Федорович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра акушерства, гинекологии и неонатологии, заведующий

Малышкина Анна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России, директор

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

Защита состоится «20» октября 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/disser\\_03082020.pdf](http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/disser_03082020.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Миома матки – одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской половой сферы, возникает у 20-40% женщин репродуктивного возраста [N.Duhan, 2011; J.Donnez, 2012; N. Bourdel, 2011; Y.Kotani, 2018].

По мнению многих авторов, в основе возникновения миомы матки лежит суммарный эффект генных и средовых факторов [В.Н.Серов, 2017; A.S.Laganà, 2017]. Подчеркивается важность следующих факторов риска развития заболевания: семейная предрасположенность [J.Y.Obed, 2011], раннее наступление менархе [A.Rizello, 2017], высокая частота медицинских аборт, наличие экстрагенитальных и гинекологических заболеваний [J.Donnez, 2016; D.Pavone, 2018; L.A.Wise, 2016; Л.В.Адамян, 2018].

До 75% больных миомой матки подвергаются оперативному лечению, каждая четвертая – это женщина репродуктивного возраста, заинтересованная в сохранении фертильности.

Проведение органосохраняющих операций чревато развитием рецидивов миомы матки. В большинстве исследований, посвященных проблеме рецидивирования миомы, риск рецидива связывают с возрастом пациенток (30-40 лет), большим количеством узлов (более трех), быстрым ростом миомы до операции, а также с гистологическими типами опухолей [Ю.Е.Караваяев, 2013; Е.А.Коган, 2016].

Несмотря на огромное количество исследований, патогенез развития миомы матки, ее рецидивирования остается предметом дискуссии; отсутствуют методы прогнозирования рецидива заболевания. В связи с этим необходима разработка методов ранней диагностики, прогнозирования рецидивов при помощи иммуногистохимического анализа, высокочувствительного метода масс-спектрометрии, который используется в течение последних лет для поиска биомаркеров различных заболеваний

[А.В.Лисица, 2016; L.De Petris, 2010; H.Wang, 2011; M.Pietrowska, 2009; A.L.Dill, 2010; P.Zürbig, 2012].

Исследования метаболома в сочетании с современными методами анализа многомерных данных позволяют выявлять биомаркеры с высокой эффективностью [J.Xia, 2013]. Биологические маркеры позволяют уточнить диагноз заболевания и предсказать его исход, понять патогенез и патофизиологические механизмы, прогнозировать прогрессирование заболевания и мониторинг его течения.

Все вышеизложенное определяет актуальность разработки новых критериев диагностики с применением неинвазивных или малоинвазивных методов обследования, позволяющих прогнозировать возможные рецидивы и темпы роста миомы. Поиск и внедрение новых методов диагностики миомы матки с определением значимых факторов рецидивирования заболевания позволит дать рекомендации в отношении дальнейшей тактики ведения пациентки, планов реализации репродуктивной функции.

#### Степень разработанности темы исследования

В клинической практике были внедрены масс-спектрометрические метаболомные тесты для диагностики и прогнозирования хронической болезни почек [H.Mishak, 2015], преэклампсии [I.A.Buhimschi, 2014], для быстрого выявления различных микроорганизмов в лабораториях микробиологии [Q.H.Meng, 2013], для диагностики болезни Крона [J.Jansson, 2009]. Протеомные подходы на основе масс-спектрометрии были предложены для диагностики рака яичников [H.Wang, 2011], молочной железы [M.Pietrowska, 2009], легких [Q.H.Meng, 2013]. В настоящее время изучаются метаболомные биомаркеры эндометриоза, которые могут помочь диагностировать заболевание, объяснить причины его развития и различные степени тяжести течения патологического процесса, а также в перспективе оказаться важным шагом в разработке новых методов и схем лечения [А.В.Борисова, 2017].

Цель исследования – Совершенствование тактики ведения больных миомой матки репродуктивного возраста на основании комплексной оценки факторов риска, прогнозирования рецидива заболевания с использованием метаболомного профилирования методом масс-спектрометрии.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинико-anamнестические данные больных миомой матки и выявить возможные факторы риска рецидива заболевания.
2. Выявить в биологических образцах (плазма крови, эндометрий, миометрий, миоматозные узлы) больных миомой матки наиболее информативную панель потенциальных биомаркеров заболевания методом масс-спектрометрии и обосновать возможность их использования в прогнозировании возникновения рецидива.
3. Провести иммуногистохимическое исследование узлов миомы матки и миометрия с определением маркеров пролиферации Ki-67, неоангиогенеза VEGF, p16, p53, ER- $\alpha$ , PgR- A.
4. Сопоставить клинико-anamнестические данные, результаты, полученные с помощью масс-спектрометрии и иммуногистохимии.
5. Определить критерии высокого риска рецидива миомы матки у больных репродуктивного возраста на основании клинико-anamнестических данных, выявленных биологических маркеров.

Научная новизна

При проведении многофакторного корреляционно-регрессионного анализа выявлены предикторы возникновения рецидива миомы матки.

Впервые доказана высокая диагностическая ценность липидомного анализа с использованием масс-спектрометрии в диагностике миомы матки и прогнозировании рецидива ММ как до операции, так и после оперативного лечения при исследовании плазмы крови, эндометрия, миоматозных узлов и

миометрия. Показано, что изменения уровня липидов при ММ отражают молекулярно-биологические механизмы, регулирующие повышенную пролиферацию, снижение апоптоза.

#### Практическая значимость

Подтверждены факторы риска развития рецидива миомы матки: метаболический синдром, семейная форма миомы матки, миомэктомия в анамнезе, наличие 3 и более миоматозных узлов.

Предложен масс-спектрометрический метод неинвазивной диагностики ММ и ее рецидива по липидному анализу плазмы крови, малоинвазивной диагностики на основании профилирования биоптата эндометрия и инвазивной диагностики по данным метаболомного профилирования тканей миометрия и миоматозных узлов.

Выявлены критерии высокого риска рецидива ММ на основании клинико-anamнестических данных, масс-спектрометрических, морфологических и иммуногистохимических показателей, что позволит определить тактику ведения пациенток, план восстановления репродуктивной функции.

#### Положения, выносимые на защиту

1. Факторами рецидивирования миомы матки являются: метаболический синдром, семейная форма миомы матки, миомэктомия в анамнезе, наличие 3 и более миоматозных узлов. Повторная миомэктомия в связи с рецидивом миомы матки выполняется в среднем через  $5,6 \pm 4,4$  лет и характеризуется сложностью оперативного лечения: обширным спаечным процессом, большей продолжительностью оперативного лечения, большим числом удаленных узлов, интраоперационной кровопотерей, требующей в ряде случаев реинфузии аутоэритроцитов.
2. Молекулярно-биологические маркеры, выявленные в миоматозных узлах, свидетельствуют об усилении пролиферации и снижении апоптоза, активации неоангиогенеза. Иммуногистохимическим фактором

рецидивирования заболевания являются повышенная экспрессия Ki-67, VEGF, ER- $\alpha$ , PgR-A, p16 в миоматозных узлах.

3. В плазме крови, миометрии, миоматозных узлах, эндометрии при метаболомном профилировании выявлены панели липидов, характерные для рецидива заболевания, что позволяет их считать предикторами рецидивирования и применять для определения хирургической тактики и восстановительного лечения.

#### Личный вклад автора

Непосредственное участие автор принимал в выборе темы научной работы, составлении дизайна исследования, методологической структуры, определении цели и задач. Осуществлял обследование пациенток, участвовал в оперативном лечении в качестве ассистента и хирурга, проводил послеоперационное лечение и динамическое наблюдение за больными. Выполнял забор биологического материала для исследования, проводил экстракцию образцов для МС анализа. Проводил статистическую обработку и интерпретацию полученных данных. Оформлял и представлял материалы в виде статей и научных докладов.

#### 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 пункту 3, 4, 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Степень достоверности полученных результатов

Степень достоверности полученных результатов достигнута за счет математической обработки материала параметрическими и непараметрическими методами. Для оценки межгрупповых различий применяли критерий  $\chi^2$  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 XXXI и XXXII Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2018, 2019), XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2018), XIX Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и Дитя - 2018", I Национальном конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике», 48<sup>th</sup> Global Congress on MIGS (Ванкувер, Канада, 2019), XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине (Москва, 2019).

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции гинекологического отделения (17.04.2020) и заседании апробационной комиссии (25.06.2020, протокол №23) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

#### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы используются в материалах семинаров, лекций, на студенческих кружках.

По теме диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 5 – в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

#### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций,

списка литературы и приложения. Работа представлена на 131 странице машинописного текста, иллюстрирована 23 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель включает 60 работ на русском языке и 143 работы на английском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В соответствии с целью и задачами с 2017 по 2019 гг. обследованы и оперированы в гинекологическом отделении отдела оперативной гинекологии и общей хирургии (руководитель – академик РАН Л.В. Адамян) 800 пациенток с миомой матки (из них 119 пациенток с рецидивом миомы матки). Изучены анамнестические особенности исследуемых групп. У 66 пациенток определен липидомный профиль плазмы крови, проведено морфологическое исследование и липидомный анализ эндометрия, миометрия и миоматозных узлов. У 15 пациенток из группы сравнения (без наличия миомы матки как по УЗИ, так и при лапароскопии) произведен забор плазмы крови и эндометрия.

Морфологическое исследование образцов тканей проведено в патоморфологическом отделении на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель отделения – д.м.н., профессор А.И. Щеголев). Масс-спектрометрическое исследование биологических образцов осуществлялось в отделе системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (заведующий – к.ф.-м.н. В.Е. Франкевич).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета статистических программ IBM SPSS Statistics V22 (США).

*Критерии включения:* репродуктивный возраст пациенток (18-45 лет); наличие миомы матки; заинтересованность пациентки в сохранении

репродуктивной функции, отсутствие гормональной терапии в течение 6 и более месяцев до операции, регулярный менструальный цикл.

*Критерии исключения:* наличие системных аутоиммунных заболеваний, тяжелой соматической патологии, онкологических заболеваний; инфекций, в том числе передающихся половым путем; сопутствующей гинекологической патологии.

Выявляли зависимость между клинико-anamnestическими данными, масс-спектрометрическими, морфологическими и иммуногистохимическими показателями.

Забор тканей миометрия и миоматозных узлов проводился во время оперативного вмешательства. Забор крови у пациенток проводился натощак накануне оперативного вмешательства. Экстракты липидов из плазмы и тканей получали в соответствии с модифицированным методом Фолча [J.Folch, 1957, V.Chagovets, 2017]. Определение молекулярного состава липидных экстрактов образцов миометрия и миоматозных узлов проводили с помощью МС с электрораспылительной ионизацией на масс-спектрометре Maxis Impact qTOF (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Определение молекулярного состава липидной фракции плазмы крови производилось на том же масс-спектрометре, соединенным с жидкостным хроматографом Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия).

Оперативное лечение (миомэктомия) выполняли эндоскопическим доступом в условиях эндотрахеального наркоза по стандартной методике.

Наряду с морфологическим исследованием проводили иммуногистохимическое исследование тканей миометрия и миоматозных узлов, оценена экспрессия маркеров Ki-67, VEGF, PgR-A, ER- $\alpha$ , p16, p53.

### Результаты собственных исследований и их обсуждение

В исследование включены 800 пациенток с диагнозом Миома матки, которым было проведено органосохраняющее хирургическое лечение. Диагноз установлен на основании данных гинекологического осмотра,

ультразвукового исследования, окончательно верифицирован во всех случаях при морфологическом исследовании.

В зависимости от отягощенности семейного анамнеза пациентки подразделены на 4 подгруппы: I) пациентки, оперированные впервые по поводу миомы матки без наличия семейного анамнеза по данной нозологии – 554 пациентки, II) пациентки, оперированные впервые по поводу миомы матки с наличием семейного анамнеза по данной нозологии - 127 пациенток, III) пациентки, оперированные по поводу рецидива миомы матки без наличия семейного анамнеза по данной нозологии – 82 пациентки, IV) пациенты, оперированные по поводу рецидива миомы матки с наличием семейного анамнеза по данной нозологии – 37 пациенток.

Средний возраст пациенток с миомой матки без семейного анамнеза составил  $37,9 \pm 5,5$  лет, с наличием семейного анамнеза –  $37,6 \pm 5,5$  лет, а пациенток с рецидивом миомы матки –  $39,9 \pm 5,2$  лет и  $39,8 \pm 5,9$  лет соответственно.

ИМТ у больных ММ и РММ был соответственно:  $24 \pm 5,0$  и  $25 \pm 4,0$ . Отмечено значимое ( $p < 0,039$ ) превышение ИМТ у больных РММ как в группе с семейным анамнезом, так и без него.

Основные жалобы пациенток, обратившихся для оперативного лечения: диспареуния, нарушения менструального цикла: болезненные, обильные менструации, межменструальные маточные кровотечения, нарушение функции смежных органов (запоры, учащенное мочеиспускание), бесплодие, невынашивание беременности.

Болевой синдром (ММ 57,4% - 391 пациентка, РММ 63,9% - 76 пациенток) и проблемы с наступлением и вынашиванием беременности (ММ 21,3% - 145 пациенток, РММ 31,9% - 38 пациенток) наиболее выражены в группе РММ. О влиянии миомэктомии на частоту наступления спонтанной беременности указывает и Tian YC в проспективном исследовании. Общая

частота спонтанной беременности увеличилась с 0% до 68,4% после органосохраняющей операции [Y.C.Tian, 2017].

Пациентки из группы ММ в 21,3% (145чел.) предъявляли жалобы на бесплодие в среднем длительностью 5,6±4,4 лет, в группе РММ бесплодие встречалось в 31,9% случаев (38чел.) в среднем длительностью 7±4,5 лет ( $p=0,015$  Хи-квадрат Пирсона 6,5).

В группе пациенток с РММ с семейным анамнезом чаще наблюдались обильные (до 91,9% - 34чел.) и болезненные менструации (до 48,6% - 18чел.) по сравнению с пациентками из других подгрупп.

При изучении наследственного анамнеза статистически значимо чаще ( $p<0,05$ ) отмечалось наличие миомы матки у ближайших родственников: у пациенток с рецидивом ММ - 56,45%, в группе с ММ – 49,2%, наличие сахарного диабета: 27,42% и 19,08% соответственно. Полученные статистические данные подтверждают наличие семейных форм миомы матки. Потенциальность семейной формы миомы матки в качестве фактора риска развития рецидива заболевания доказана и в исследовании Jesse Y. Obed [Jesse Y. Obed, 2011].

При анализе акушерского анамнеза выявлены различия в исследуемых группах. Общее число беременностей на одну пациентку распределилось по группам следующим образом: 1,3±1,8- в группе ММ, 1,3±1,5- в группе РММ.

Из общего числа беременностей у пациенток из группы ММ было больше родов 43,5% (296чел.), и внематочных беременностей – 3,2% (22чел.), а в группе РММ преобладает количество абортов - 28,6% (34чел.), самопроизвольных выкидышей – 1,6% (2чел.), неразвивающихся беременностей – 17,1% (21чел.).

В группе с ММ больше соматически здоровых женщин (51,1% - 348чел.), что связано с преобладанием пациенток более молодого возраста (от 30 до 40 лет).

В ходе изучения сопутствующей гинекологической патологии, отмечена статистически значимая большая частота сочетания спаечного процесса в малом тазу (42% - 50чел.,  $p = 0,0003$  Хи-квадрат Пирсона 34,3), доброкачественных образований яичников и патологии эндометрия в группе с рецидивом ММ.

При анализе данных о структуре перенесенных гинекологических оперативных вмешательств в группах сравнения выявлены статистически значимые различия, наиболее часто встречалось Кесарево сечение: группа I – 7,8% - 43чел., II – 9,5% - 12чел., III – 7,3% - 6чел., IV – 18,9 % - 7чел. В группе с рецидивом ММ также выше число оперативных вмешательств по поводу доброкачественных новообразований яичников (до 9,3 % - 11чел.),  $p=0,026$  Хи-квадрат Пирсона 4,95.

В группе рецидива ММ отмечена большая продолжительность оперативного лечения (I –  $92,8 \pm 40$  мин, II –  $94,6 \pm 39,4$  мин, III –  $106,4 \pm 54,8$  мин, IV –  $122,7 \pm 61,4$  мин), что указывает на сложность проведения повторной органосохраняющей операции; большая интраоперационная кровопотеря (I – 194,1мл, II – 234,7мл, III – 214,3 мл, IV – 299,2 мл), чаще требовалась реинфузия аутоэритроцитов (до 27% случаев),  $p = 0,001$ .

В группе рецидива ММ отмечено большее число удаленных миоматозных узлов (I – 3 узла, II – 4 узла, III – 5 узлов, IV – 6 узлов),  $p = 0,0001$ , но размер удаленных узлов преобладал в группе ММ (I – 8,1см, II – 8,6 см, III – 6,3 см, IV – 6,8см),  $p = 0,00004$ . Согласно мета-анализу, проведенному Ming X., частота рецидивирования выше при количестве узлов 5 и более и не зависела от доступа оперативного вмешательства (лапаротомия, лапароскопия) [X.Ming, 2020].

Послеоперационный период у пациенток протекал без осложнений. Все пациентки выписаны на 3-5 сутки в удовлетворительном состоянии без осложнений.

Отдаленные результаты после проведенного лечения оценивались через 12, 18 и 24 месяца после оперативного вмешательства. В группе впервые выявленной миомы матки процент рецидивирования через 12 месяцев составил 7,9%, в группе исходного рецидива - 15,7%, через 24 месяца – 15,8% и 31,2% соответственно.

В течение 12 – 18 месяцев в группе исходного рецидива беременность наступила в 9,7%, в группе впервые возникшей миомы матки – в 34,2% случаев.

При анализе двух подгрупп рецидива ММ выявлено, что повторная миомэктомия понадобилась в среднем через  $5,6 \pm 4,4$  лет.

На следующем этапе определялся липидный состав тканей миометрия и миоматозных узлов.

При изучении тканей миометрия и миомы было идентифицировано 296 липидов. 66 соединений липидов были квалифицированы как обладающие статистически значимой разницей в уровне между впервые диагностированной миомой матки и ее рецидивом в тканях миоматозного узла и 39 как обладающие статистически значимой разницей в уровне между впервые диагностированной миомой матки и ее рецидивом в тканях миометрия.

Анализ метаболических путей показал высокую вовлеченность значимых липидов в образцах миоматозных узлов в метаболизме линолевой кислоты, метаболизме глицерофосфолипидов, эфирных липидов, сфинголипидов с достаточным уровнем статистической значимости ( $p < 0.05$ ) (Рисунок 1).

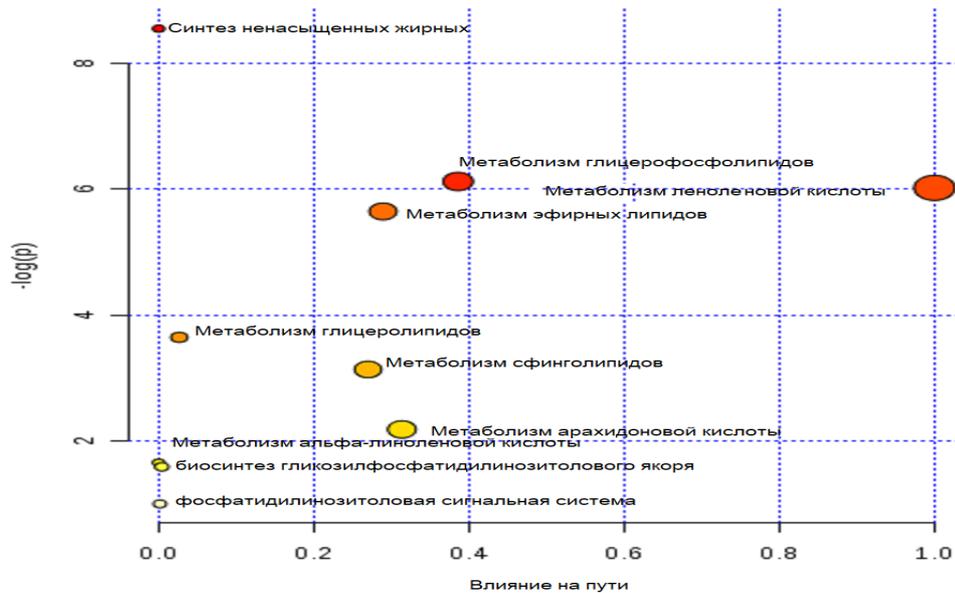


Рисунок 1. Диаграмма метаболических путей для липидов со значимым изменением уровня в миоме при рецидиве миомы.

Со статистической значимостью ( $p < 0.05$ ) выявлено, что липиды, показавшие высокий уровень различий в образцах миометрия в группах ММ и РММ, участвуют в метаболизме глицерофосфолипидов, липидов с эфирной связью, сфинголипидов (Рисунок 2).

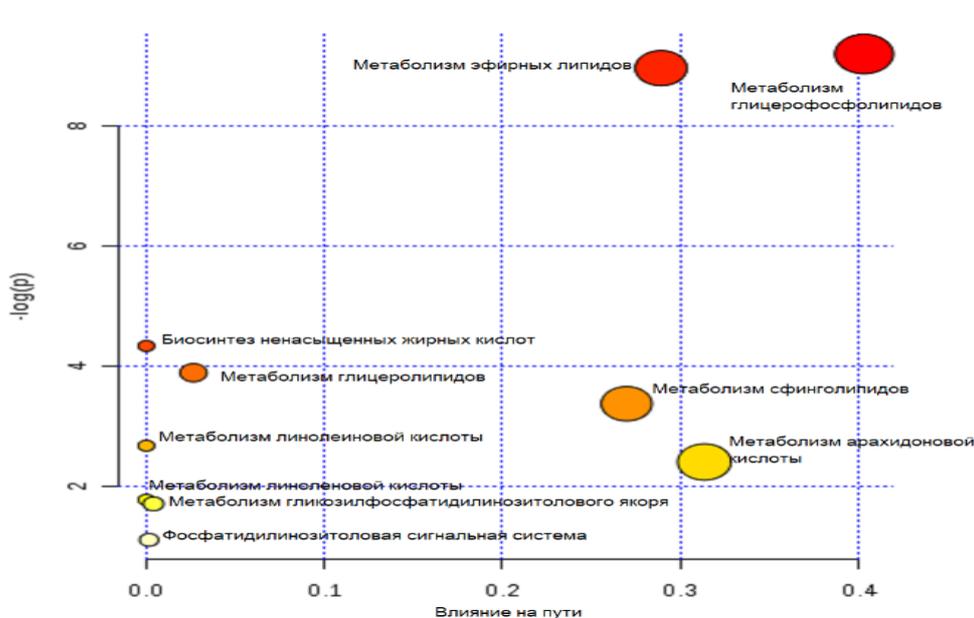


Рисунок 2. Диаграмма метаболических путей для липидов со значимым изменением уровня в миометрии при рецидиве миомы.

Соединения липидов, значимые для тканей миометрия и миоматозных узлов, преимущественно задействованы в метаболизме глицерофосфолипидов и сфинголипидов (Рисунок 3), что свидетельствует об общих метаболических процессах для миометрия и миомы при рецидиве заболевания. В тоже время метаболизм линолевой кислоты претерпевает изменения только в клетках миомы. Изменения в метаболизме линолевой кислоты в клетках миомы по сравнению с клетками миометрия, а также изменением жирнокислотного профиля клеток были отмечены Islam M.S. и Castellucci M. [M.S.Islam, 2018].

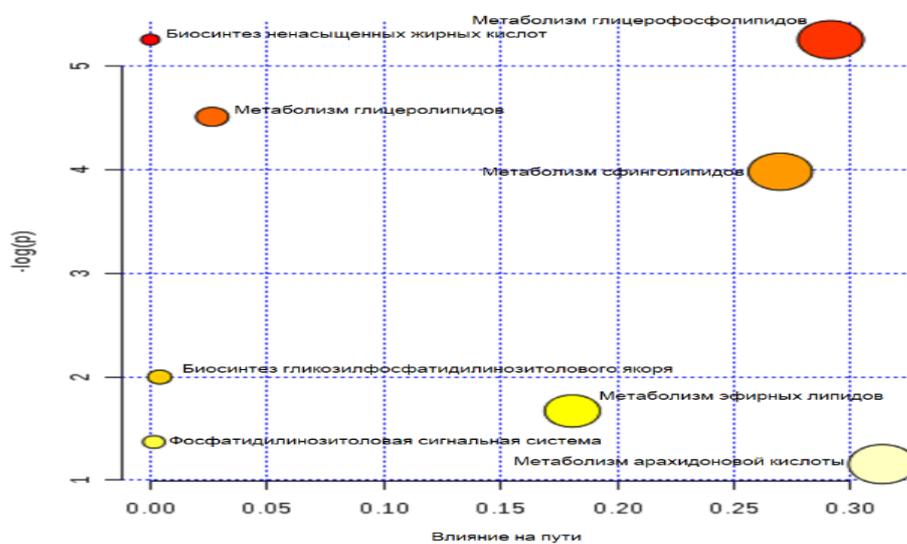


Рисунок 3. Диаграмма метаболических путей для липидов со значимым изменением уровня, общих для миоматозных узлов и миометрия при рецидиве миомы матки.

В проведенном исследовании определяли и липидный состав тканей эндометрия.

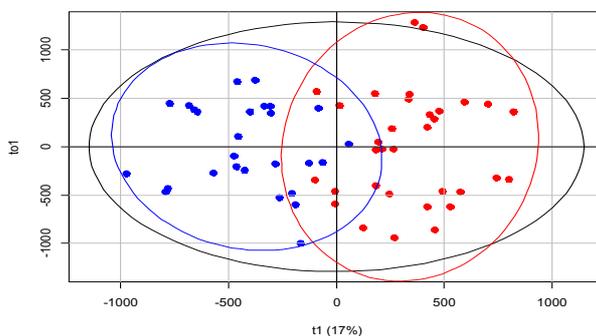
В результате проведенного анализа эндометрия у пациенток с рецидивом миомы матки отмечен наименьший уровень липидов следующих классов: церамиды, сфингомиелины, фосфатидилсерины (исключения - PS 34:0, PS 36:0, PS 42:5, PS 46:1), фосфатидилэтаноламины (исключения - PE 44:2, PE 38:3, PE 42:6, PE 44:6, PE O-38:3, PE O-38:4), фосфатидилхолины (исключения - PC 38:5, PC 36:4, PC O-38:1, PC O-38:0, PC O-38:2, PC 38:2, PC 40:0), фосфатидилглицеролы с суммарной длиной цепи меньше 40 атомов

углерода. В группе рецидива миомы матки (по сравнению с группой ММ и группой сравнения) отмечен наибольший уровень липидов следующих классов: лизофосфатидилхолины, фосфатидилглицеролы с суммарной длиной цепи больше 40 атомов углерода.

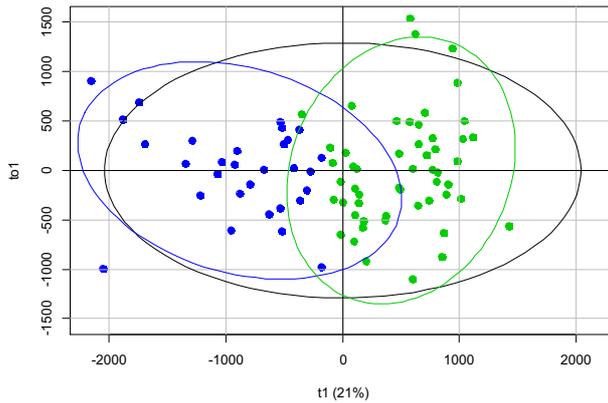
На следующем этапе исследовали плазму крови с целью выявления биомаркеров рецидивирования миомы матки, что позволит прогнозировать рецидив заболевания на предоперационном этапе и определить объем последующего оперативного вмешательства.

В образцах плазмы крови было идентифицировано 267 липидных соединений. Для поиска потенциальных биомаркеров уровни липидов были проверены на выполнение критерия Манна–Уитни в парах «группа сравнения-впервые диагностированная миома», «группа сравнения-рецидив миомы» и «впервые диагностированная миома-рецидив миомы». У 43 липидов были найдены статистически значимые различия в первом случае, у 64 – во втором и у 87 – при впервые диагностированной миоме и при рецидиве.

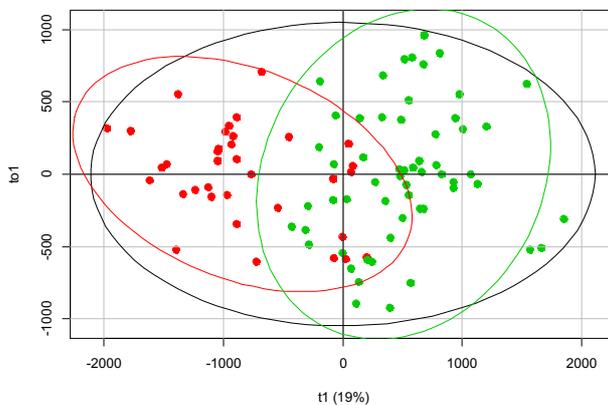
На основе данных об уровне потенциальных биомаркеров в плазме крови были построены OPLS-DA модели для классификации пациенток из группы сравнения, пациенток с впервые диагностированной миомой и пациенток с рецидивом миомы (Рисунок 4).



а) группа сравнения / впервые диагностированная миома



б) группа сравнения / рецидив миомы



в) впервые диагностированная миома/рецидив миомы

Рисунок 4. График счетов, построенный по результатам OPLS-DA анализа хромато-масс-спектрометрических данных при попарном сравнении липидного состава крови пациенток из группы сравнения (синий цвет), пациенток с впервые выявленной миомой матки (красный цвет) и пациенток с рецидивом миомы матки (зеленый цвет).

Наибольший вклад в модель классификации ( $VIP > 1$ ) контроль/миома вносили фосфатидилхолины (LPC 18:2, PC 16:0\_20:3, PC 18:0\_18:1, PC 18:0\_20:3 в случае впервые диагностированной миомы, и PC 16:0\_22:6, PC 16:0\_18:2, PC 16:0\_20:3, PC 18:0\_20:3, PC 18:0\_18:1 в случае рецидива) и сфингомиелины (SM d18:1/22:0, SM d18:/22:1, SM d18:1/24:0 в случае впервые

диагностированной миомы, и SM d18:1/24:1, SM d18:2/24:1 в случае рецидива)  
(Рисунки 5, 6).

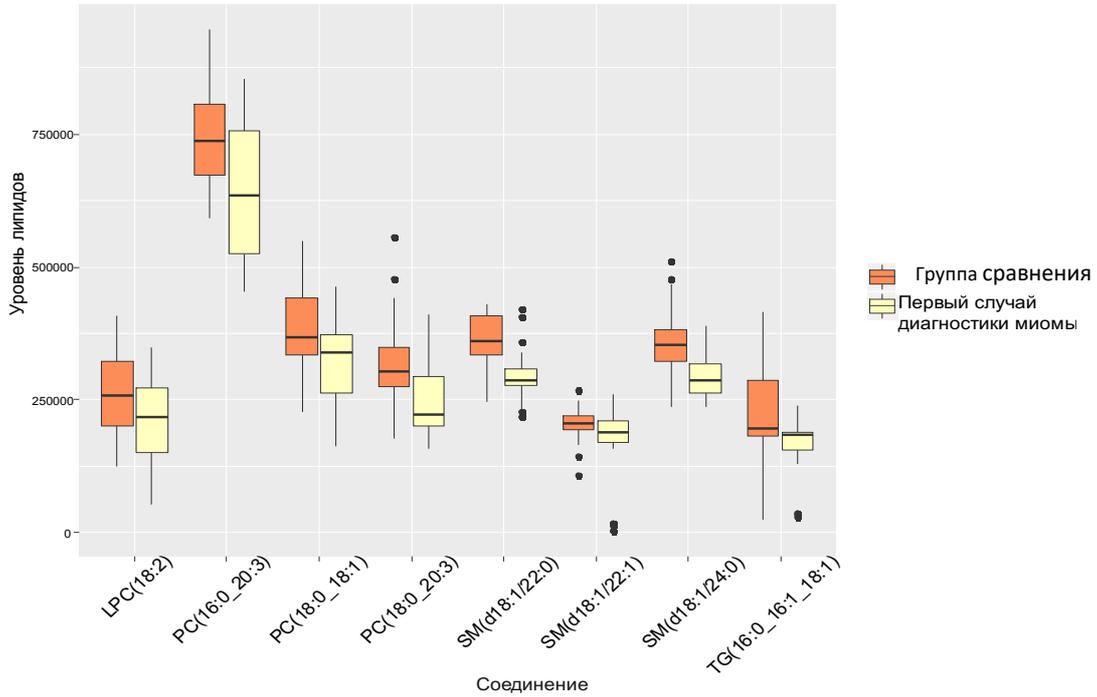


Рисунок 5. Диаграмма размаха уровней в условных единицах липидов-маркеров в группе сравнения и при впервые диагностированной миоме.

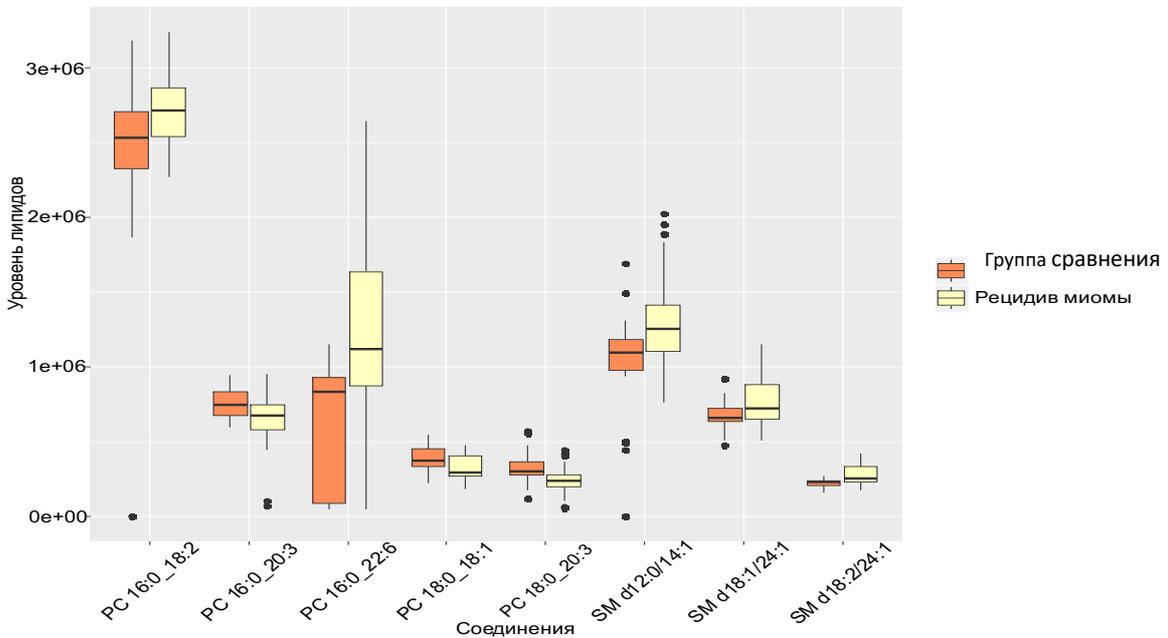


Рисунок 6. Диаграмма размаха уровней в условных единицах липидов-маркеров в группе сравнения и при рецидиве.

Построенные на основе выбранных липидов диагностические модели с использованием логистической регрессии показывают чувствительность и

специфичность 88% и 86% для диагностики впервые возникшей миомы и 95% и 79% для рецидива миомы, что говорит о потенциальной возможности использования панели липидных биомаркеров для неинвазивной диагностики миомы по масс-спектрометрическому анализу плазмы крови.

Липиды, определенные как потенциально значимые в плазме крови для классификации впервые диагностированной миомы/рецидив миомы, относятся к классам холестериновых эфиров (CE 18:2, CE 20:4), фосфатидилхолинов (PC 16:0\_22:6, PC 18:0\_18:2), сфингомиелинов (SM d12:0/14:1, SM d18:1/22:0, SM d18:1/22:1, SM d18:1/24:0, SM d18:1/24:1, SM d18:2/16:0, SM d18:2/24:1) и триглицеридов (TG 14:1\_18:1\_18:2, TG 16:0\_16:1\_18:2, TG 16:0\_18:1\_18:2, TG 16:1\_18:0\_18:1, TG 16:1\_18:0\_18:3, TG 18:1\_18:2\_18:3) (Рисунок 7). В ряде случаев липиды, являющиеся потенциальными маркерами для впервые возникшей миомы, не являются таковыми для рецидива или их уровень изменяется в отличную от группы сравнения сторону (Рисунок 8).

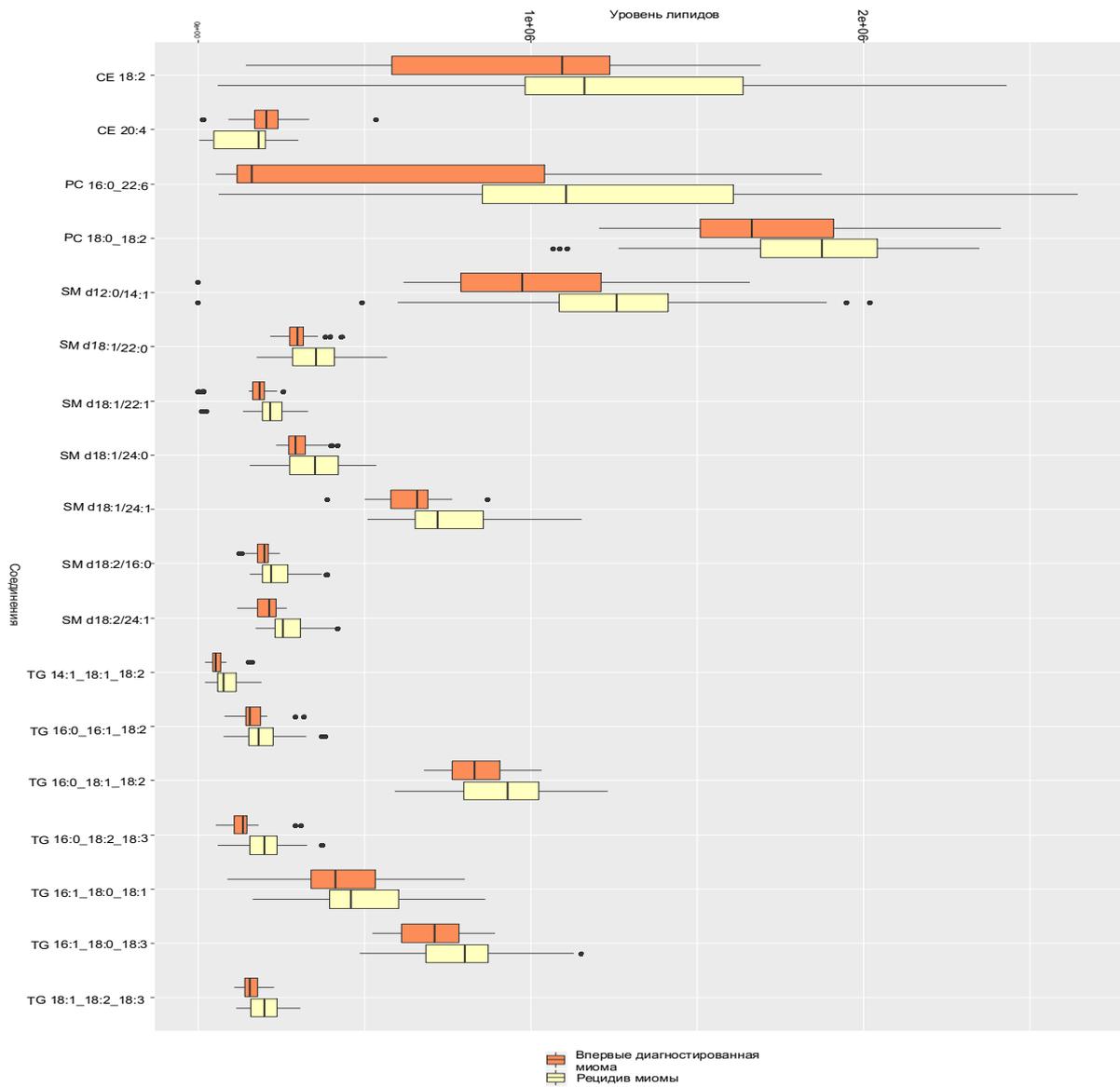


Рисунок 7. Диаграмма размаха уровней в условных единицах липидов-маркеров при впервые диагностированной миоме и при рецидиве.

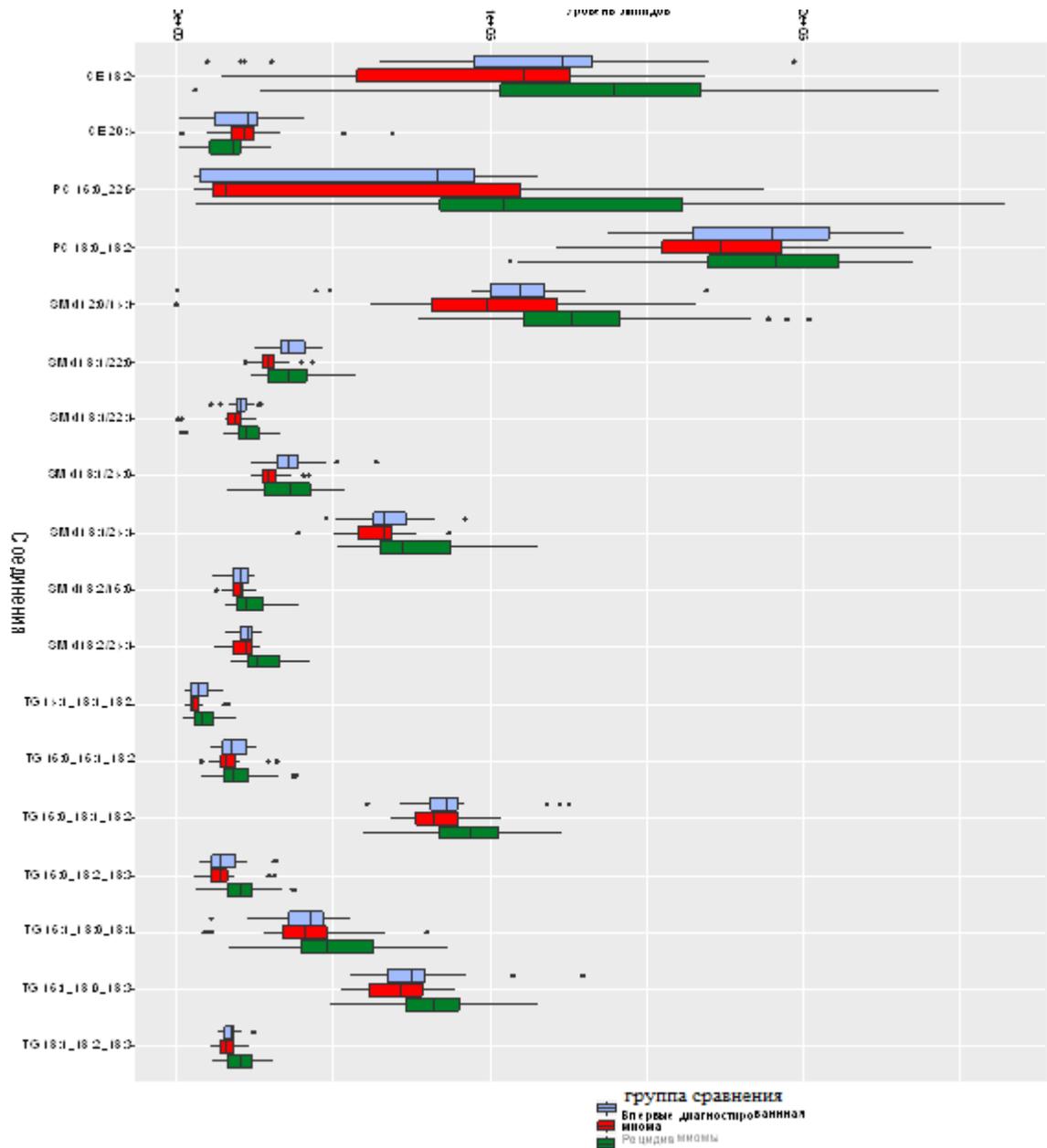


Рисунок 8. Уровни липидов-маркеров в группе сравнения (синий), группе впервые диагностированной миомы матки (красный) и при рецидиве (зеленый).

У пациенток, оперированных по поводу миомы матки впервые и в связи с рецидивом заболевания, проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование тканей миометрия и миоматозных узлов, изучена экспрессия маркеров Ki-67, VEGF, PgR-A, ER- $\alpha$ , p16, p53,

которые являются взаимосвязанными компонентами сигнального пути – classical nuclear estrogen receptor pathway (Рисунок 9 А-З).

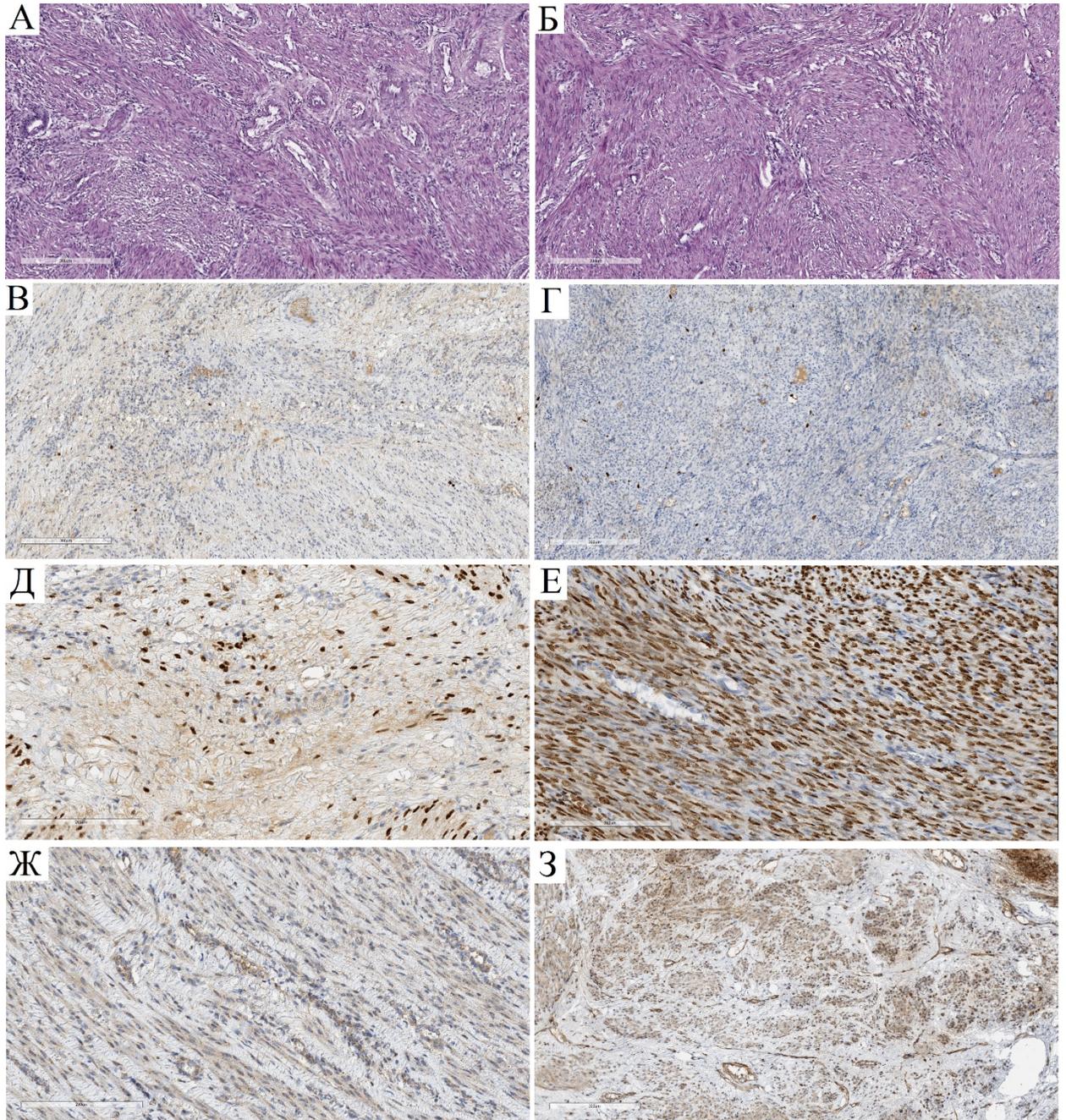


Рисунок 9. Экспрессия иммуногистохимических маркеров в миометрии и ткани лейомиомы тела матки. А. Ткань миометрия, окраска г/э, Б. Ткань лейомиомы, окраска г/э. В. Экспрессия Ki-67 в миометрии, Г. Экспрессия Ki-67 в лейомиоме, Д. Экспрессия рецептора к прогестерону в миометрии, Е. Экспрессия рецептора к прогестерону в лейомиоме. Ж. Экспрессия VEGF в миометрии, З. Экспрессия VEGF в лейомиоме, x100.

В результате проведенного исследования выявили экспрессию Ki-67 в миоматозных узлах у пациенток с ММ -  $3,4 \pm 2,4\%$ , с РММ -  $6,2 \pm 3,9\%$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ -  $5,2 \pm 5,8\%$ , с РММ -  $3,9 \pm 2,6\%$ . Уровень Ki-67 выше в образцах миомы у пациенток с РММ ( $p=0,031$ ), что может отражать пролиферативный потенциал опухоли, наиболее подверженной рецидивированию. Ki-67 может являться косвенным маркером рецидива заболевания. Xing-HuaLiao et al. установили высокую экспрессию Ki-67 в миоме матки в сравнении с гладкомышечными клетками миометрия [X.H.Liao, 2017]. В исследовании M.Nisolle выявлено незначимое увеличение экспрессии Ki - 67 в миоматозных узлах по сравнению с тканью миометрия [M.Nisolle, 1999].

Экспрессия VEGF в образцах миоматозных узлов у пациенток с ММ составила  $0,8 \pm 0,4\%$ , с РММ –  $0,8 \pm 0,4\%$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ -  $0,2 \pm 0,4\%$ , с РММ -  $0,2 \pm 0,4\%$ . Уровень VEGF выше в миоматозных узлах по сравнению с образцами миометрия у пациенток как с ММ, так и с РММ. Аналогичные данные получены Кононенковым и соавторами в 2018г. Учеными установлена более выраженная экспрессия VEGF в лейомиомах по сравнению с соседним миометрием, а в лейомиосаркомах экспрессия VEGF выше, чем в лейомиомах [В.И.Коненков, 2018].

Экспрессия PgR-A в образцах миоматозных узлов у пациенток с ММ составила  $257 \pm 13$ , с РММ –  $271 \pm 16$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ -  $256 \pm 21$ , с РММ -  $238 \pm 20$  (по H-score). Экспрессия ER- $\alpha$  в образцах миоматозных узлов у пациенток с ММ составила  $93 \pm 20$ , с РММ –  $101 \pm 18$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ -  $78,8 \pm 17,8$ , с РММ -  $80,8 \pm 13,5$  (по H-score). Уровни ER- $\alpha$  и PgR-A ( $p 0,012$ ) выше в миоматозной ткани у пациенток с РММ, что отражает потенциал роста опухоли. По данным M.Nisolle высокий уровень эстрогеновых рецепторов также был выше в миоме, но только в фазу пролиферации [M.Nisolle, 1999].

Экспрессия p53 в образцах миоматозных узлов у пациенток с ММ составила  $2,9 \pm 2,3\%$ , с РММ –  $5,3 \pm 4,6\%$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ –  $2,8 \pm 3,2\%$ , с РММ –  $1,4 \pm 1,5\%$ . Наши данные согласуются с опубликованными ранее результатами, которые свидетельствуют, что мутации в гене *TP 53* и, соответственно, изменения экспрессии белка p53 не являются ведущими в патогенезе миомы матки [E.Kuhn, 2012; S. Nakverdi, 2013].

Экспрессия p16 в образцах миоматозных узлов у пациенток с ММ составила  $22,5 \pm 9,6\%$ , с РММ –  $32,6 \pm 13,4\%$ , в ткани миометрия у пациенток с ММ –  $11,4 \pm 10,2\%$ , с РММ –  $6,6 \pm 4,7\%$ . Уровень p 16 ( $p 0,02$ ) выше в миоматозных узлах у пациенток с РММ. По данным Atkins et al. p16 преимущественно экспрессируется в лейомиосаркомах; данный маркер может быть полезен в дифференциальной диагностике STUMP (стромальная опухоль из гладкомышечных клеток с неясным потенциалом злокачественности) и лейомиосаркомы [К. А. Atkins, 2008].

В образцах тканей идентифицированы протеины, факторы роста, которые в последующем могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров заболевания и его рецидивирования.

Таким образом, в результате анализа клинико-anamnestических данных, метаболомного профилирования и иммуногистохимического анализа, выявлены клинические, морфологические особенности рецидива миомы матки, отличия в метаболомном профиле плазмы крови и тканей эндометрия, миометрия и миоматозных узлов.

## Выводы

1. Факторами рецидивирования миомы матки являются: метаболический синдром, семейная форма миомы матки, миомэктомия в анамнезе, наличие 3 и более миоматозных узлов. В группе впервые выявленной миомы матки процент рецидивирования через 12 месяцев составил 7,9%, в группе исходного рецидива - 15,7%, через 24 месяца – 15,8% и 31,2% соответственно. Необходимость повторного оперативного вмешательства по поводу рецидива миомы матки возникает в среднем через  $5,6 \pm 4,4$  лет после предшествующей миомэктомии.
2. Основными показаниями к оперативному лечению явились: болевой синдром, аномальные маточные кровотечения, постгеморрагическая анемия, нарушения репродуктивной функции при отсутствии других причин, большие размеры узлов. Болевой синдром (ММ 57,4%, РММ 63,9%) и проблемы с наступлением и вынашиванием беременности (ММ 21,3%, РММ 31,9%) наиболее выражены у пациенток с рецидивом миомы матки. В группе пациенток с РММ чаще наблюдались обильные (91,9%) и болезненные (48,6%) менструации. Пациентки с рецидивом миомы матки страдали бесплодием в 31,9% случаев в среднем длительностью  $7 \pm 4,5$  лет, а структура беременностей была представлена абортами (28,6%) и/или неразвивающимися беременностями (17,1%).
3. Липидный профиль плазмы крови больных миомой матки отличается от такового у пациенток группы сравнения. Наиболее значимые изменения выявлены в липидоме у больных с РММ, характерные только для рецидива заболевания и представлены следующими липидами: фосфатидилхолины (РС 18:0\_18:2, РС 16:0\_22:6), холестериновые эфиры (СЕ 18:2, СЕ 20:4), триглицериды (TG 14:1\_18:1\_18:2, TG 16:0\_16:1\_18:2, TG 16:0\_18:1\_18:2, TG 16:0\_18:2\_18:3, TG 16:1\_18:0\_18:1, TG 16:1\_18:0\_18:3, TG 18:1\_18:2\_18:3), сфингомиелины (SM d12:0/14:1, SM d18:1/22:0, SM d18:1/22:1, SM d18:1/24:0, SM d18:1/24:1, SM d18:2/16:0, SM d18:2/24:1).

4. Липидомный анализ тканей позволяет дать прогноз в отношении возможного рецидива миомы матки. В эндометрии у пациенток с рецидивом миомы матки отмечен наименьший уровень липидов следующих классов: церамиды, сфингомиелины, фосфатидилсерины (исключения - PS 34:0, PS 36:0, PS 42:5, PS 46:1), фосфатидилэтаноламины значимые (исключения - PE 44:2, PE 38:3, PE 42:6, PE 44:6, PE O-38:3, PE O-38:4), фосфатидилхолины (исключения - PC 38:5, PC 36:4, PC O-38:1, PC O-38:0, PC O-38:2, PC 38:2, PC 40:0), фосфатидилглицеролы с суммарной длиной цепи меньше 40 атомов углерода и наибольший уровень липидов следующих классов: лизофосфатидилхолины, фосфатидилглицеролы с суммарной длиной цепи больше 40 атомов углерода.

5. Нарушения метаболизма линолевой кислоты в тканях миоматозных узлов (при МС анализе) являются прогностическим критерием рецидивирования миомы матки.

6. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование миоматозных узлов у больных с рецидивом миомы матки выявило высокую экспрессию Ki-67, VEGF, p16, ER- $\alpha$  и PgR-A, что может служить предиктором рецидивирования миомы матки.

7. На основании комплексного анализа данных клинко-морфологического и МС исследований даны рекомендации в практику здравоохранения, что позволит повысить эффективность реконструктивных операций и снизить число рецидивов миомы матки.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с миомой матки необходимо проведение тщательного сбора анамнеза с выявлением факторов риска рецидивирования (с указанием семейной предрасположенности к миоме матки, предшествующих миомэктомий с особенностями хода операции) перед выполнением органосохраняющей операции.
2. Органосохраняющие операции по поводу миомы матки требуют особого навыка, специальной техники и оснащения, использования новых хирургических методик. Особую сложность представляют операции, связанные с рецидивом заболевания, в связи с обширным спаечным процессом, большим объемом кровопотери, требующим в ряде случаев реинфузии аутоэритроцитов.
3. Перед проведением оперативного лечения для прогнозирования рецидива миомы матки и определения тактики хирургического лечения целесообразно проведение липидного профилирования методом масс-спектрометрии плазмы крови и/или эндометрия, что позволит повысить эффективность операции, снизить риск рецидива и улучшить репродуктивные исходы.
4. Иммуногистохимическое и масс-спектрометрическое исследования тканей миоматозных узлов и миометрия определяют дальнейшую тактику ведения пациентки и реализации репродуктивной функции.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рецидивы миомы матки. Современный взгляд на проблемы диагностики, лечения и прогнозирования / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, Л. В. Адамян // Акушерство и гинекология. – 2019. – Т. 3. – С. 32-38.
2. Анализ липидного состава плазмы крови методом масс-спектрометрии у пациенток с миомой матки / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко,

В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2019. – Т. 25. – №. 6.

3. Возможности прогнозирования рецидива миомы матки по липидному анализу плазмы крови / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // Журнал Акушерство и гинекология. – 2019. – №. 11.

4. Изменение липидома эутопического эндометрия женщин с эндометриозом и миомой матки при различных фазах менструального цикла / Д. Ф. Салимова, Н. Л. Стародубцева, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. М. Тоноян, С. В. Павлович, В. Е. Франкевич // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. – 2020. – Т. 8. – №. 1 (27).

5. Рецидивы миомы матки: вопросы диагностики, лечения и перспективы / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2018).

6. Рецидив миомы матки у женщин репродуктивного возраста: новые подходы в диагностике и лечении / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // XXXI международный конгресс с курсом эндоскопии. Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний (Москва, 2018).

7. Сравнительный анализ липидного профиля эндометрия среди женщин с эндометриозом и миомой матки / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // XIX Всероссийский научно-образовательный форум "Мать и Дитя - 2018".

8. Рецидив миомы матки. Клинические и молекулярно-биологические параллели / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // XXXII Международный конгресс с курсом эндоскопии (Москва, 2019).

9. Прогнозирование рецидивов миомы матки по анализу метаболома плазмы крови / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // I Национальный Конгресс с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике (Москва, 2019).

10. Analysis of the plasma lipid composition in patients with uterine myoma and recurrent fibroids using mass spectrometry / Tonoyan Narine M., Chagovets Vitaliy V., Tokareva Alisa O., Starodubtseva Nataliia L., Kozachenko Irena F., Adamyan Leyla V., Frankevich Vladimir E. // 48<sup>th</sup> Global Congress on MIGS (Vancouver, 2019).

11. Предикция рецидива миомы матки на основе липидного анализа тканей миометрия и миоматозных узлов / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине (Москва, 2020).

12. Прогнозирование рецидива миомы матки на основании масс-спектрометрического анализа тканей миометрия и миоматозных узлов / Н. М. Тоноян, И. Ф. Козаченко, В. Е. Франкевич, В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Н. Л. Стародубцева, Л. В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2020. – Т. 26. – №. 2.

**Критерии высокого риска рецидива миомы матки у больных репродуктивного возраста на основании клинико-анамнестических данных, выявленных биологических маркеров.**



---

<sup>1</sup> Подписано в печать 18.08.2020г.  
Формат А5  
Объем 1.0 усл.п.л.  
Тираж 100 экз. Заказ No  
Отпечатано в типографии