

УДК 618.14-006.36-089.873-036.87:615.2773

Хорольский Вадим Александрович

кандидат медицинских наук,
доцент кафедры акушерства,
гинекологии и перинатологии
Кубанского государственного
медицинского университета,
заведующий родильного отделения
Перинатального центра Государственного
бюджетного учреждения, Краевой
клинической больницы №2г. Краснодара
vadim23_67@mail.ru

Ордяниц Ирина Михайловна

кафедра акушерства и гинекологии
с курсом перинатологии Российского
университета дружбы народов
vadim23_67@mail.ru

Карданова Виктория Владимировна

Медицинский центр женского здоровья
womanmed@mail.ru

Стыкин Ярослав Олегович

кафедра акушерства и гинекологии
с курсом перинатологии Российского
университета дружбы народов
vadim23_67@mail.ru

Vadim A. Horolsky

candidate of medical sciences,
associate professor of obstetrics,
gynecology and perinatology
The Kuban state medical university,
manager of delivery room
Perinatal center State budgetary
establishment, Regional clinical
hospital No. 2g. Krasnodar
vadim23_67@mail.ru

Irina M. Ordiyants

department of obstetrics and gynecology
with a course of perinatology Russian
university of friendship of the people
vadim23_67@mail.ru

Victoria V. Cardano

Medical center female health
womanmed@mail.ru

Yaroslav O. Stykin

department of obstetrics
and gynecology with a course
of perinatology Russian
university of friendship
of the people
vadim23_67@mail.ru

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И РИСК РАЗВИТИЯ МИОМЫ МАТКИ И АДЕНОМИОЗА

THE ASSOCIATION OF GENETIC MARKERS WITH THE RISK OF UTERINE FIBROIDS

Аннотация: *Обследовано 64 женщины с миомой матки, средний возраст которых составил $40,1 \pm 0,8$ (18-48) лет. Проводилось генотипирование шести молекулярно-генетических маркеров (полиморфизмов -351A/G и -397 T/C гена *ESR α* , полиморфных маркеров генов фактора некроза опухоли α , рецептора фактора некроза опухоли 1-го и 2-го типов и лимфотоксина α). У женщин с миомой матки наибольший объем матки имели носители генотипов CT (488 см^3), -351 AA ($558,3 \text{ см}^3$), -351GG ($448,4 \text{ см}^3$), CC (307 см^3) эстрогенового рецептора альфа и гомозиготы 1/1 ($362,8 \text{ см}^3$) рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа. У носителей других генотипов размеры и объем матки не превышали 12 нед беременности. Изучение молекулярных механизмов регуляции апоптоза и клеточной пролиферации открывает новые перспективы для консервативного лечения этих наиболее распространенных заболеваний, а также их профилактики и реабилитации*

Ключевые слова: *миома матки, аденомиоз, молекулярно-генетические маркеры*

Annotation: *Were examined 64 women with uterine fibroids at the age of $40,1 \pm 0,8$ (18-48) years. Genotyping was performed six molecular genetic markers (polymorphisms -351A/G and -397 T/C gene *ESR α* , gene polymorphisms of tumor necrosis factor α , tumor necrosis factor receptor 1-st and 2-nd type and lymphotoxin α). In women with uterine fibroid uterus had the largest volume of genotype CT (488 cm^3), -351 AA (558.3 cm^3), -351GG (448.4 cm^3), CC (307 cm^3), the estrogen receptor alpha and homozygotes 1/1 (362.8 cm^3), tumor necrosis factor receptor type 2. For other genotypes size and uterine volume did not exceed 12 weeks of pregnancy.*

The study of the molecular mechanisms of regulation of apoptosis and cell proliferation opens up new prospects for the medical treatment of the most common diseases and their prevention and rehabilitation.

Keywords: *uterine fibroids, adenomyosis, molecular genetic markers*

Введение

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению этиопатогенеза так называемых «пролиферативных заболеваний», они продолжают оставаться наиболее частыми показаниями к оперативному лечению в

гинекологической практике. По поводу миомы матки выполняется до 50-70% оперативных вмешательств в гинекологических стационарах, из которых 60,9-95,5% приходится на радикальные операции, в том числе у совсем юных женщин, не успевших реализовать свою репродуктивную функцию (Сидорова И.С., 2007; Алтухова О.Б., Чурносков М.И., 2010).

Существующая в настоящее время гормональная терапия миомы матки и аденомиоза имеет ряд существенных недостатков. После прекращения гормонального лечения у большинства пациенток происходит рецидив клинической симптоматики. Заслуживает также внимания выраженность побочных эффектов и большое число противопоказаний к гормональной терапии. Поэтому актуальной задачей гинекологии является органосохраняющее лечение больных миомой матки и аденомиозом.

В последние годы при рассмотрении механизмов формирования миомы матки и эндометриоза внимание многих исследователей привлечено к изучению процесса пролиферации и апоптоза-новому виду гибели клеток путем включения специальной генетической программы самоуничтожения. Регулирование апоптоза на генно-молекулярном уровне позволяет сохранять генетически запрограммированное для каждой ткани постоянство числа клеток на протяжении жизни человека. Индукторами апоптоза являются факторы некроза опухоли и их рецепторы, которые способны оказывать цитоксическое воздействие на опухолевые клетки *in vivo*, а также вызывать геморрагический некроз не повреждая при этом здоровые клетки. Некоторые исследователи показали в своих работах связь данных цитокинов с риском возникновения миомы матки и эндометриоза (Кулагина Н.В., 2008; Алтухова О.Б., 2010; Конева О.А., 2011).

Не определены факторы, способствующие быстрому и множественному росту миоматозных узлов. Поэтому дальнейшие исследования этих генетических маркеров позволят: выявить генетическую предрасположенность, уточнить системные механизмы, определяющие развитие заболевания, возможность прогнозирования быстрых темпов роста опухоли и разработать новые подходы к лечению больных.

Цель исследования: оценить степень ассоциации генетических маркеров с риском развития миомы матки и аденомиоза и разработать наиболее значимые клинико-лабораторные критерии прогнозирования и ранней диагностики их сочетаний.

Материал и методы исследования

В соответствии с целью исследования изучено репродуктивное здоровье 200 женщин в возрасте от 18 до 48 лет, из них: 64 с миомой матки (I группа), 33 - с миомой матки в сочетании с аденомиозом (II группа) и 103 - без миомы матки и аденомиоза, контрольная (III) группа.

Критерии включения: наличие миомы матки и аденомиоза, верифицированных эхографически, гистероскопически и/или гистологически. *Критерии исключения:* беременность, злокачественные заболевания женских половых органов. Все клинические исследования проводились с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-диагностических меро-

приятый, проводимых за период госпитализации и после, связанной с заболеванием, для научно-исследовательских целей.

Комплекс лабораторных и инструментальных исследований включал: ультразвуковое исследование органов малого таза, аспирационную биопсию эндометрия, гистероскопию, отдельное диагностическое выскабливание слизистой цервикального канала и слизистой матки с последующим гистологическим исследованием полученного соскоба (по показаниям), генотипирование шести молекулярно-генетических маркеров (полиморфизмов -351A/G и -397 T/C гена ESR α , полиморфных маркеров генов фактора некроза опухоли α , рецептора фактора некроза опухоли 1-го и 2-го типов и лимфотоксина α).

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета ФГАОУ ВПО «Белгородского государственного национального исследовательского университета» (НИУ БелГУ). Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5 М раствор ЭДТА (рН=8.0). Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР локусов проводилась на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) для ПЦР в режиме real time с использованием готовых наборов реагентов производства ФГУП «ГосНИИ генетика».

Статистическая обработка полученных результатов производилась с помощью пакета статистических программ Statistica v.6.0. и программы Microsoft Office Excel 2007. С целью оценки соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использовали критерий χ . При изучении взаимосвязей генетических полиморфизмов с количественными признаками в начале оценивали характер распределения исследуемых признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. Последующий статистический анализ проводили в соответствии с характером распределения исследуемых количественных признаков. При нормальном распределении признака для его описания использовали среднее арифметическое значение и ошибку среднего арифметического значения, а для сравнительного анализа - критерий Стьюдента. При несоответствии закону нормального распределения для описания признака применяли медиану (M) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа - критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования

Все обследованные женщины вошли в возрастную категорию от 18 до 48 лет. Средний возраст пациенток с миомой матки (I группа) составил $40,1 \pm 0,8$ лет и с миомой матки в сочетании с аденомиозом (II группа) - $43 \pm 0,9$ лет. Т.е., каждая третья пациентка с миомой матки и аденомиозом была в позднем репродуктивном возрасте (46-48 лет). Средний возраст женщин в контрольной группе (III группа) составил $30,5 \pm 0,6$ лет ($p < 0,05$).

До настоящего времени не известно, почему клетки эндометрия, проникнув в толщу миометрия или за пределы матки, не только сохраняют необычайно высокую выживаемость, но и функциональную активность, способность к

пролиферации, гиперплазии, а быстрое увеличение миоматозных узлов не сопровождается повышением митотической активности клеток.

С целью решения этих вопросов нами были изучены процессы пролиферации и апоптоза (программированной клеточной смерти) с помощью 4 интегринов-индукторов апоптоза и полиморфизмов эстрогенового рецептора альфа. Генетический анализ был направлен на изучение ассоциаций полиморфных маркеров генов эстрогенового рецептора альфа, фактора некроза опухоли альфа (-308 G/A TNF α), лимфотоксина альфа (+250 A/G Lt α), рецептора фактора некроза опухоли 1-го типа (+36 A/G TNFR1), рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа (-322 VNTR TNFR2) у пациенток с миомой матки и аденомиозом. Результаты исследования показали, что для всех рассмотренных маркеров в популяционной выборке и для большинства маркеров в группе больных миомой матки и аденомиозом эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Среди обследованных нами женщин контрольной группы частота носительства генотипов CC(-397 T/C) и GG(-351 A/G) ESR α была в 1,6 раза выше, а генотипа -397 TT почти в 2 раза и генотипа -308 GA в 1,4 раз ниже, чем средне популяционная.

Межгрупповые различия частот встречаемости генотипов изученных полиморфизмов представлены на рис.1. При сравнительном анализе распределения частот генотипов полиморфизмов -397 T/C и -351 A/G ESR α между группами выявлено, что частота встречаемости гомозиготного генотипа GG полиморфизма (-351 A/G) ESR α была в 1,5-2 раза ниже у пациенток имеющих миому матки в сочетании с аденомиозом по сравнению с женщинами с миомой матки и контрольной группой. В распределении частот других генотипов (AA, AG) полиморфизма (-351 A/G) и (CT, CC, TT) полиморфизма -397 T/C достоверных различий не выявлено.

Анализ частот генотипов полиморфных маркеров -308 G/A TNF α , +250 A/G Lt α показал, что гетерозиготные генотипы -308 GA и +250 GA в 1,5-3 раза реже встречались у пациенток с миомой матки и аденомиозом (II группа) по сравнению с миомой матки (I группа) и контрольной (III группа), а генотип +250 GG в 4-5 раз чаще встречался у пациенток, имеющих миому матки в сочетании с аденомиозом по сравнению с миомой и контрольной группой.

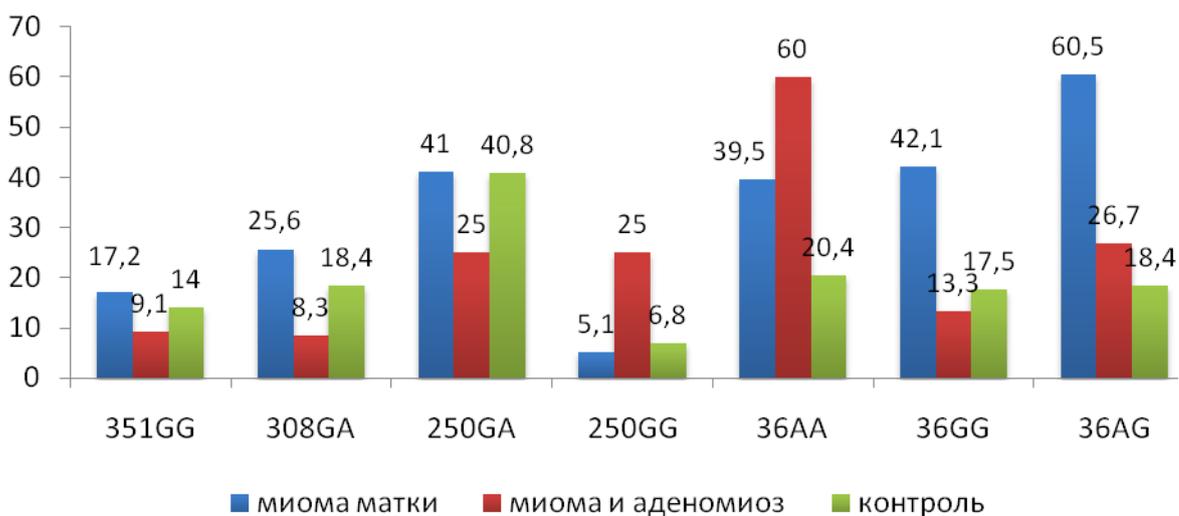


Рис.1 Межгрупповые различия изученных полиморфизмов, %

В распределении частот других генотипов (GG, AA) полиморфизма -308 G/A TNF α и генотипа AA полиморфизма +250 A/G Lta достоверных различий выявлено не было. По результатам распределения частот генотипов полиморфного маркера +36 A/G TNFR1 мы получили увеличение частоты встречаемости гомозиготного генотипа +36 AA в I и II группе по сравнению с группой контроля в 2-3 раза. Следует также отметить, что частота встречаемости этого генотипа у пациенток с миомой матки и аденомиозом (II группа) была в 1,5 раза выше, чем с миомой матки (I группа). Концентрация генотипа +36GG и +36GA была в 2-3 раза больше у женщин с миомой матки (I группа) по сравнению со II и III группой. В распределении частот генотипов полиморфного маркера -322 VNTR TNFR2 достоверных различий выявлено не было.

Обсуждение

Исследование взаимосвязей полиморфных маркеров всех изучаемых нами генов со средними размерами и объемом матки показало, что для всех генетических полиморфизмов был характерен объем матки, соответствующий 12 нед беременности, что может указывать на определенную роль изученных полиморфизмов в патогенезе развития данных заболеваний. У носителей полиморфизмов -397CC, -351 AG эстрогенового рецептора альфа, -308 GG фактора некроза опухоли альфа, всех полиморфизмов гена Lta, +36 AA, +36 GG TNFR1 и 2/2 рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа в I группе исследования были более высокие значения размеров и объема матки (превышающие 12 нед беременности). Только у носителей генотипов CT, TT гена ESR α , AG (+36 A/G) и 2/1 гена TNFR2 размеры матки соответствовали 12 нед беременности. Во II группе исследования наибольший объем матки имели носители генотипов CT (488 см³), -351 AA (558,3 см³), -351GG (448,4 см³), CC (307 см³) эстрогенового рецептора альфа и гомозиготы 1/1 (362,8 см³) рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа. У носителей других генотипов размеры и объем матки не превышали 12 нед беременности.

Проведенный нами анализ особенностей ассоциаций генетических полиморфизмов эстрогенового рецептора альфа, фактора некроза опухоли и их рецепторов с характером поражения матки в зависимости от локализации миоматозных узлов показал, что почти у каждой второй пациентки в I группе и у каждой третьей во II группе локализация миоматозных узлов была субсерозно-интерстициальная. Несколько реже встречалась субсерозная локализация миоматозных узлов: у каждой второй гомозиготы +250 AA, гетерозиготы 1/1, 2/1 в I группе, у носителей гетерозиготного генотипа 2/1 во II группе и у каждой третьей носительницы генотипов CT, -351AA, -308GG, +36AA в I группе и TT, +250AA во II группе исследования.

Следует отметить, что сочетанная локализация миоматозных узлов гораздо чаще встречалась у женщин, имеющих миому матки в сочетании с аденомиозом: почти у каждой третьей гетерозиготы CT и у гомозигот TT, -351AA, -351GG, +250GG, +250AA, AA(+36 A/G) и 2/2 (-322 VNTR). Интерстициальная миома матки обнаружена у каждой третьей гомозиготы по аллелю А (+36 A/G) в I группе исследования и у каждой четвертой во II группе. Интрамурально-субмукозные узлы одинаково редко встречались в обеих группах исследования.

Взаимосвязь генетических полиморфизмов с характером поражения матки миоматозными узлами, размерами и темпами роста представлена на рис. 2,3.

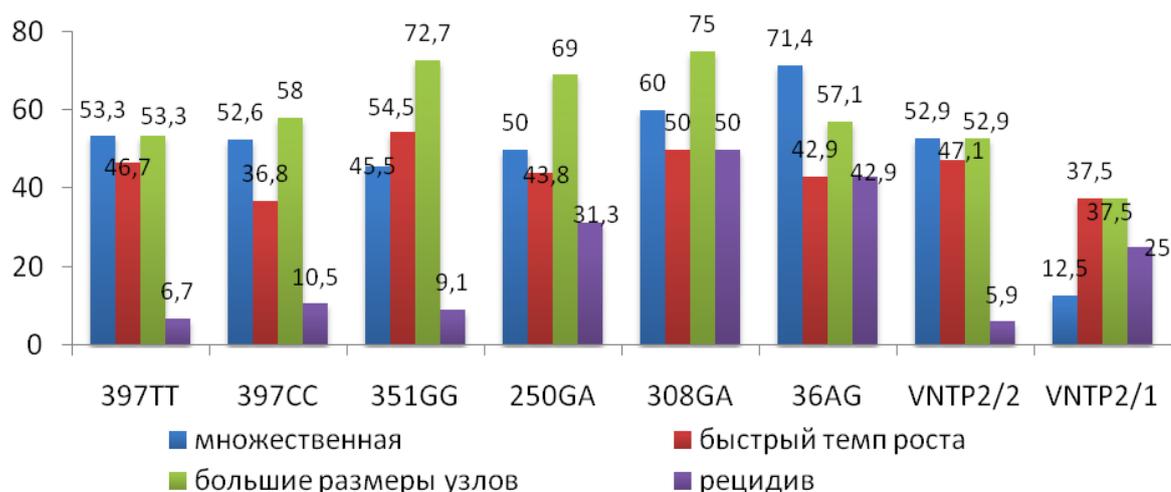


Рис.2. Взаимосвязь генетических маркеров с характером миоматозных узлов, %

Больше половины либо все женщины из II группы исследования (кроме носительниц генотипов -308GG и +36AA) имели множественную миому матки. В I группе множественная миома матки чаще встречалась у носительниц гетерозиготных генотипов -308GA (60%), +36AG (71,4%), гомозигот по аллелю T-у 53,3%, по аллелю C-у 52,6% и гомозигот 2/2 (52,9%), а также у половины женщин, имеющих генотипы +250GG, +250GA и -351AG. Множественная миома матки в обеих группах чаще наблюдалась у носителей генотипов CC и TT (полиморфизма -397T/C), -308GA, +250GG, +250GA, +36AG и 2/2 (-322 VNTR).

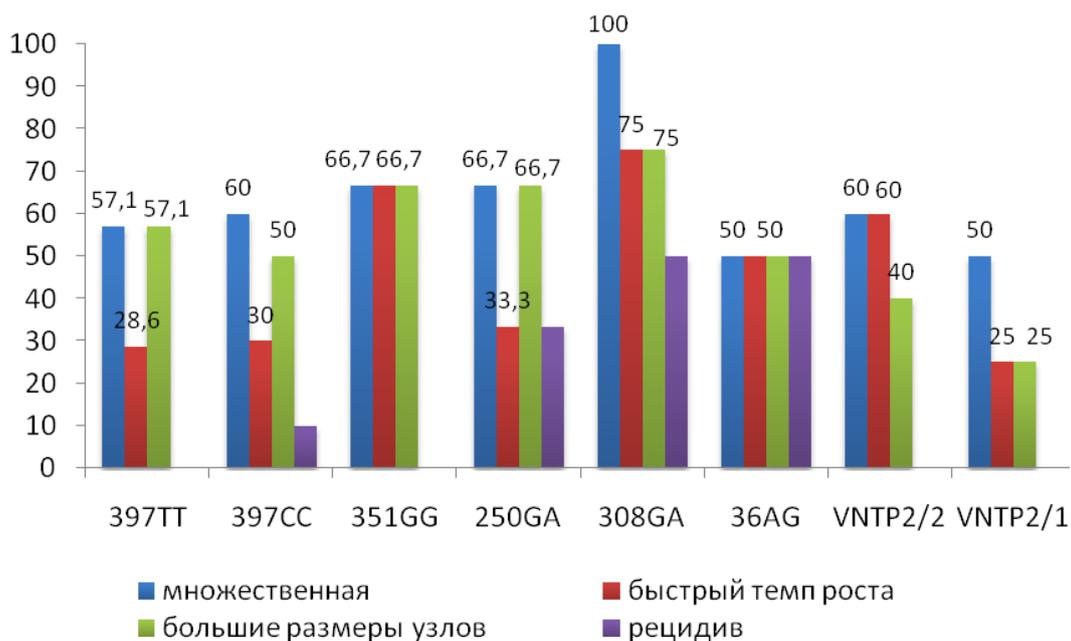


Рис.3. Взаимосвязь генетических маркеров с характером миоматозных узлов при сочетании миомы с аденомиозом, %

Одиночная миома матки чаще встречалась у всех гомозигот полиморфизма +36AG, гомозиготных носителей -308GG и +250 AA, а также у гетерозигот CT и 2/1 (полиморфизма -322 VNTR) в I группе исследования. Во второй группе одиночная миома матки чаще выявлялась у гомозигот -308GG (55,6%) и +36 AA (55,6%). Одиночные миоматозные узлы в обеих группах встречались у носителей генотипов -308GG, +250AA, +36AA, +36GG и 2/1 (-322VNTR). У носителей гетерозиготных генотипов CT (-397 T/C), -351AG,-308AA в обеих группах исследования миоматозные узлы не увеличивались в размерах либо отмечался медленный и постепенный рост лейомиомы. У гомозигот -308 GG и +250AA в I группе в 72,4% и 72,6% случаев темпы роста опухоли были медленными, во II группе эти генотипы одинаково отвечали как за медленный, так и за быстрый рост миоматозных узлов. Как видно по данным рис. 4,5 у каждой второй носительницы генотипов TT, CC полиморфизма -397 T/C в I группе, GG (-351 A/G), -308 GA, +250 GA, +36AG и 2/2 (-322 VNTR) в I и II группе и у каждой третьей гомозиготы CC, TT (-397 T/C) и гетерозиготы +250 GA во II группе темпы роста миоматозных узлов были быстрыми. У 11 (58%) женщин с генотипом -397 CC, 8(53,3%)- с генотипом TT полиморфизма -397 T/C, 8(72,7%) с генотипом -351 GG, у 11(69%) гетерозигот +250 GA, 7(75%) пациенток с генотипом -308 GA, 4(57,1%) гетерозигот +36 AG, и у 9 (52,9%) гомозигот 2/2 и у 6 (37,5%) гетерозигот 2/1 (-322 VNTR) в группе с миомой матки были большие размеры миоматозных узлов (> 3 см). В группе с миомой и аденомиозом носители этих же генотипов также отличались большими размерами миоматозных узлов: -397 CC -5 (50%), -397 TT-4(57,1%), -351 GG -2(66,7%), +250 GA -

2(66,7%), -308 GA 3(75%), +36 AG -2 (50%), 2/2 VNTR -2 (40%) и 2/1 VNTR -1 (25%) соответственно.

Полученные результаты позволяют заключить, что гомозиготные генотипы TT и CC полиморфизма -397 T/C, GG полиморфизма (-351 A/G), 2/2 (-322 VNTR), а также гетерозиготы +250 GA, -308GA и +36 AG ассоциируются с риском формирования множественной миомы матки с быстрыми темпами роста и большими размерами миоматозных узлов. Генотипы +250AA, -308GG, +36AA, +36 GG и 2/1 могут ассоциироваться с развитием одиночных миоматозных узлов с постепенными темпами роста. Генотипы CT, AA и GG (-308A/G), + 36 GG и 2/1 (-322 VNTR) могут отвечать за медленные и постепенные темпы роста миоматозных узлов. В ходе проведенного исследования также установлено, что у каждой второй носительницы гетерозиготных аллелей -308GA, +36AG, у каждой третьей гетерозиготы +250 GA в I и II группе отмечался рецидив миомы матки через некоторое время после проведенного оперативного лечения.

Для прогнозирования и ранней диагностики сочетания миомы матки и аденомиоза более информативен сочетанный анализ полиморфизмов генов эстрогенового рецептора альфа (ESR α), фактора некроза опухоли альфа (TNF α), лимфотоксина альфа (L α) и рецепторов фактора некроза опухоли 1-го и 2-го типа (TNFR1, TNFR2). Изучение молекулярных механизмов регуляции апоптоза и клеточной пролиферации открывает новые перспективы для консервативного лечения этих наиболее распространенных заболеваний, а также их профилактики и реабилитации.

Результатом окончательного анализа полученных данных стала разработка алгоритма: претендентами на генетическое исследование по генам факторов некроза опухоли и эстрогеновым рецепторам являются женщины с клинико-анамнестическими факторами риска, выявленными вследствие скрининга. При наличии повышенного генетического риска развития миомы и аденомиоза проводится комплекс фундаментальных методов диагностики, таких как сонографическое, гистероскопическое и морфологическое, от результатов которых зависит выбор тактики консервативного лечения или органосохраняющих операций.

Литература:

1. Алтухова О.Б., Чурносков М.И. Распределение молекулярно-генетических маркеров при миоме матки // *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. - Выпуск № 11 / том 16 / 2010. – с. 33- 37.

2. Конева О. А. Клинико-генетическое исследование больных генитальным эндометриозом: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук. - Белгород, 2011. - 18 с.

3. Кулагина, Н. В. Консервативное лечение гиперпластических процессов органов репродуктивной системы // *Акушерство и гинекология*. - 2010. - № 4. - С. 82-86.

4. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Коган Е.А. и др. Миома матки в сочетании с аденомиозом. Пути фармакологической коррекции. // *Научно-практический журнал «Врач» №3, М., 2007, стр. 94-96.*

Literature:

1. Altukhova O. B., Churnosov M. I. Distribution of molecular and genetic markers at uterus myoma//Scientific sheets of the Belgorod state university. - *ÉÚ»Òβ*—№ 11/volume 16 / 2010. – page 33 - 37.
2. Koneva O. A. Kliniko-genetichesky research of patients with genital endometriosis: abstract yew.... candidate of medical sciences. - Belgorod, 2011. - 18 with.
3. Kulagina, N. V. Conservative treatment of hyper plastic processes of bodies of reproductive system//Obstetrics and gynecology. - 2010. - No. 4. - Page 82-86.
4. Sidorova I.S., Unanyan A.L., Kogan E.A., etc. Uterus myoma in combination with the adenomiozy. Ways of pharmacological correction.//Scientific and practical magazine "Doctor" No. 3, M., 2007, p. 94-96.