

На правах рукописи

ГАРАЖА ЯНА БОРИСОВНА

**НАРУЖНЫЙ ГЕНИТАЛЬНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ: РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ
РЕЦИДИВА**

14.01.01 – акушерство и гинекология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ).

Научный руководитель:

д.м.н., профессор, академик РАН

Адамян Лейла Вагоевна

Научный консультант

д.м.н., профессор

Акуленко Лариса Вениаминовна

Официальные оппоненты:

Ярмолинская Мария Игоревна – доктор медицинских наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел эндокринологии репродукции, руководитель

Малышкина Анна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор

Ведущее учреждение:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно - исследовательский институт акушерства и гинекологии» Министерства здравоохранения Московской области

Защита диссертации состоится « 23 » июня 2021 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 208.041.06, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20 стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (127206, г. Москва, ул. Вучетича, д.10а) и на сайте <http://dissov.msmsu.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

АКУЛЕНКО Лариса Вениаминовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эндометриоз является одним из самых загадочных гинекологических заболеваний. Распространённость эндометриоза достигает 10-15% среди женщин репродуктивного возраста, что составляет более 190 миллионов женщин в возрасте от 15 до 49 лет по всему миру (Zondervan K. T. et al., 2020).

Эндометриоз – доброкачественное разрастание за пределами полости матки ткани, по структурным и функциональным свойствам подобной эндометрию. Эндометриоз характеризуется тазовой болью, дисменореей, диспареунией, дизурическими явлениями, в 20-48% случаев у пациенток диагностируется первичное или вторичное бесплодие (Адамян Л.В. и соавт., 2021).

Отсутствие эффективных биомаркеров и патогномоничных симптомов приводит к задержке диагностики эндометриоза на 6-10 лет (Ghai V. et al., 2020; Surrey E. et al., 2020). Данные ультразвукового исследования, которое применяется в качестве первой линии диагностики, не позволяют в ряде случаев диагностировать очаги эндометриоза на начальных стадиях (при отсутствии жалоб и клинических проявлений). Золотым стандартом диагностики наружного генитального эндометриоза (НГЭ) является лапароскопия с последующим гистологическим исследованием иссеченных очагов. Эффективная диагностика рецидивов НГЭ также осуществляется посредством лапароскопии, что является травматичным для пациенток в физическом и моральном аспектах (Nirgianakis K. et al., 2020).

Вышеперечисленные факторы определяют актуальность разработки новых эффективных малоинвазивных и неинвазивных методов диагностики эндометриоза.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время для поиска биомаркеров различных заболеваний активно используют «омиксные» технологии: геномику, транскриптомику, метаболомику, протеомику. Широкое распространение получили исследования генетических аспектов эндометриоза: экспрессии генов, уровня различных микроРНК, однонуклеотидных полиморфизмов.

В мировой литературе опубликовано множество статей, касающихся изучения экспрессии генов при эндометриозе (Mirza Z. et al., 2020; Dai F-F. et al., 2020). Количество дифференциально экспрессирующихся генов при эндометриозе по

данным различных авторов варьируется от нескольких генов до сотен. Borisov N.M. et al. показали, что даже если в отдельном гене произошла мутация, его функция может выполняться в полном объеме благодаря компенсаторным механизмам. Подобная компенсация обеспечивается работой сигнальных путей – каскадов белок-белковых взаимодействий, которые осуществляют передачу сигнала внутри клетки. Было доказано, что именно степень активации внутриклеточных сигнальных путей является более качественным маркером патологического процесса, чем экспрессия генов (Borisov N.M. et al., 2014).

Одним из направлений современных исследований в области эндометриоза является сравнение эутопического и эктопического эндометрия по различным параметрам (экспрессия генов, микроРНК). Было показано, что образцы эндометрия данных локализаций схожи по морфологическим признакам, однако это не привело к созданию диагностического теста (Klemmt P.A.V. et al., 2011). В связи с этим актуальным является изучение генетических и молекулярных параметров эутопического и эктопического эндометрия, поиск возможной взаимосвязи между данными изменениями и выявление наиболее информативных генетических маркеров.

Цель исследования

Повышение эффективности ранней диагностики и прогнозирования рецидивов наружного генитального эндометриоза на основе изучения дифференциальных профилей экспрессии генов в эутопическом и эктопическом эндометрии.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-anamnestические особенности пациенток репродуктивного возраста с наружным генитальным эндометриозом и выявить частоту и клинические факторы риска рецидивирования.
2. Методами секвенирования нового поколения и биоинформатического анализа изучить профили экспрессии генов и степень активации внутриклеточных сигнальных путей в образцах эутопического и эктопического эндометрия женщин, страдающих наружным генитальным эндометриозом, и образцах эндометрия женщин, не имеющих данного заболевания; оценить диагностическую значимость дифференциально экспрессирующихся генов.

3. Сравнить паттерны экспрессии генов в эутопическом эндометрии пациенток с НГЭ, у которых был выявлен рецидив в течение 2 лет наблюдения, и эутопическом эндометрии пациенток, у которых не было выявлено рецидива за указанный период времени, охарактеризовать функциональные свойства выявленных дифференциально экспрессирующихся генов.
4. Оценить диагностическую и прогностическую значимость характеристик экспрессии выявленных генов и возможность их использования для создания диагностической и прогностической панели маркеров наружного генитального эндометриоза.
5. На основании полученных результатов оптимизировать алгоритм ранней диагностики наружного генитального эндометриоза и тактики ведения пациенток после оперативного лечения с целью профилактики рецидива заболевания.

Научная новизна

На основании проведенного сравнительного анализа молекулярно-генетических характеристик эндометрия пациенток с наружным генитальным эндометриозом и женщин, не имеющих данного заболевания, а также проведения пятикратной кросс-валидации данных секвенирования исследуемых образцов впервые выявлена генная подпись эндометрия, характерная для наружного генитального эндометриоза. Данная подпись состоит из пяти генов - LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDP - экспрессия которых в эндометрии пациенток с НГЭ понижена.

Впервые проведен анализ активации внутриклеточных сигнальных путей для подбора генетических маркеров для ранней диагностики НГЭ. Показана эффективная дифференциация образцов эутопического эндометрия пациенток с НГЭ и пациенток группы сравнения при использовании полученной генной подписи.

Впервые разработан отечественный инновационный метод малоинвазивной диагностики НГЭ и его рецидива по анализу экспрессии генов в образце эутопического эндометрия.

Практическая значимость

Подтвержден высокий риск развития наружного генитального эндометриоза у женщин с отягощенным семейным анамнезом по данному заболеванию, выявлены клиничко-анамнестические факторы высокого риска рецидивирования: III/IV стадия НГЭ, сумма баллов по классификации r-AFS > 46.

Изучение ближайших и отдаленных результатов лечения показало высокую

эффективность реконструктивных операций при эндометриозе как для верификации диагноза, так и для определения тактики ведения пациенток.

Молекулярно-генетическое исследование полученных биологических образцов, позволило выявить генную подпись эндометрия, которая эффективно дифференцирует эндометрий пациенток с НГЭ и эндометрий женщин, не имеющих данного заболевания. Данная подпись, состоящая из пяти генов (*LMNA*, *KDM6B*, *CIC*, *PER1*, *PPDPF*) продемонстрировала значительную прогностическую силу ($AUC > 0,95$) и высокие значения чувствительности (0,823) и специфичности (1,0) в диагностике НГЭ.

Сравнительный анализ молекулярно-генетических характеристик эндометрия пациенток с НГЭ, проведенное с учетом последующего развития рецидива данного заболевания, позволило выявить дифференциально экспрессирующиеся гены и дифференциально активированные сигнальные пути, которые могут быть использованы в качестве предикторов рецидивирования НГЭ.

Предложены маркеры НГЭ, применение которых позволит существенно повысить эффективность как диагностики, так и определения тактики лечения женщин, страдающих данным заболеванием.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. У пациенток с семейным анамнезом, отягощенным наружным генитальным эндометриозом, вероятность развития данного заболевания выше, а III/IV стадия распространения эндометриоза и сумма баллов по классификации r-AFS > 46 являются факторами риска рецидивирования данного заболевания.

2. Эутопический эндометрий при наружном генитальном эндометриозе существенно отличается от эндометрия пациенток, не имеющих данного заболевания, по уровню экспрессии генов и степени активации внутриклеточных сигнальных путей.

3. Сходство молекулярно-генетических характеристик эутопического и эктопического эндометрия у пациенток с наружным генитальным эндометриозом определяет целесообразность использования генетической подписи, состоящей из генов *LMNA*, *KDM6B*, *CIC*, *PER1* и *PPDPF*, для ранней диагностики заболевания.

4. Анализ экспрессии генов *PSMB2*, *TANC1*, *EXOSC6*, *OGFOD1* и степени активации сигнального пути Cellular-Apoptosis-Pathway-Gene-Expression-FLIP-CIAP2-

BFL1-BCL2-via-NFKB2 в образце эутопического эндометрия позволяет выделить пациенток группы высокого риска рецидивирования наружного генитального эндометриоза после хирургического лечения.

Личный вклад автора

В рамках данной работы автором разработан дизайн исследования, сформирована исследуемая выборка пациенток и банк биологических образцов для исследования. Автор непосредственно участвовала в обследовании и ведении пациенток, включенных в исследование; проведении биоинформатического анализа данных, полученных в результате РНК-секвенирования исследуемых биологических образцов; и статистической обработке полученных данных. Автором лично подготовлены научные публикации по теме исследования, оформлены диссертация и автореферат.

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.

Апробация работы

Апробация диссертации была проведена на заседании кафедры репродуктивной медицины и хирургии ФДПО ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России 12 февраля 2021 г.

Основные положения работы доложены и обсуждены на российских и международных конференциях: XI и XII Международных конгрессах по репродуктивной медицине (Москва, 2017, 2018); XXX и XXXI Международных конгрессах с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2017, 2018); 17th World Congress of Gynecological Endocrinology (Флоренция, 2016); 17th World Congress on Human Reproduction (Рим, 2017); Форуме университетской науки МГМСУ (Москва, 2017); AAGL Global Endometriosis Summit (Рейкьявик, 2017); AAGL Global Congress on Minimally Invasive Gynecologic Surgery (США, 2016, 2017, 2018, 2020); 18th World Congress of Gynecological Endocrinology (Флоренция, 2018); 48th AAGL Global Congress on Minimally Invasive Gynecologic Surgery (Ванкувер, 2019).

Внедрение результатов работы в практику

Полученные научные и практические данные внедрены в учебный процесс кафедры репродуктивной медицины и хирургии ФДПО ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова МЗ РФ.

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 5 - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 154 страницах и состоит из введения, 4 глав, посвященных обзору литературы, клинической характеристике больных и описанию методов исследования, результатам собственных наблюдений, полученных в ходе выполнения работы, обсуждению полученных результатов, а также выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 27 рисунками. Библиографический указатель содержит 240 источников: 21 отечественный и 219 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведен сравнительный анализ результатов обследования и лечения 50 женщин репродуктивного возраста с гистологически верифицированным диагнозом наружный генитальный эндометриоз, поступивших в плановом порядке для хирургического лечения в гинекологическое отделение городской клинической больницы им. С.И. Спасокукоцкого (ГКБ 50), клиническую базу кафедры репродуктивной медицины и хирургии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, в период с 2015 по 2019 гг. Группу сравнения составили 35 женщин репродуктивного возраста, у которых по данным обследования и лапароскопической операции не было выявлено эндометриоза.

Критерии включения в исследуемую группу: репродуктивный возраст (18-49 лет), письменное информированное согласие пациентки, гистологически верифицированный наружный генитальный эндометриоз.

Критерии включения в группу сравнения: репродуктивный возраст (18-49 лет), письменное информированное согласие пациентки; отсутствие наружного

генитального эндометриоза, подтвержденное лапароскопически.

Критерии исключения: патология эндометрия (гиперплазия эндометрия, полип эндометрия, эндометрит), миома матки, аденомиоз, злокачественные новообразования в анамнезе, прием гормональной терапии или применение внутриматочной системы в течение 1 года до оперативного вмешательства.

Для решения поставленных задач исследование проводилось в несколько этапов. На первом этапе исследования всем пациенткам было проведено клиничко-анамнестическое обследование: сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, лабораторное и инструментальное обследование (УЗИ органов малого таза).

На втором этапе всем пациенткам было проведено эндоскопическое оперативное лечение с помощью эндовидеохирургического оборудования фирмы «Karl Storz» (Германия) в условиях эндотрахеального наркоза по стандартной закрытой методике в положении Тренделенбурга. Интраоперационно проводилась ревизия органов брюшной полости и малого таза. Пациенткам с НГЭ в соответствии с выявленной формой заболевания были проведены резекция яичников в пределах здоровых тканей или энуклеация капсулы эндометриоидной кисты, коагуляция и/или иссечение эндометриоидных очагов, адгезиолизис. Для исключения патологии эндометрия проводили гистероскопию с диагностическим выскабливанием полости матки или ЦУГ-биопсию эндометрия с последующим гистологическим исследованием. У пациенток исследуемой группы в качестве изучаемого биологического материала были получены образцы эндометрия и минимум одного очага эндометриоза, у пациенток группы сравнения – только образцы эндометрия.

На третьем этапе исследования было проведено РНК-секвенирование всех исследуемых образцов и проведение сравнительного анализа экспрессии генов и степени активации сигнальных путей во всех анализируемых образцах ткани.

На четвертом этапе исследования у пациенток с НГЭ оценивали эффективность проведенного лечения при клиничко-инструментальном обследовании в течение 2 лет. Рецидив эндометриоза был установлен посредством гинекологического осмотра и УЗИ органов малого таза. Был проведен ретроспективный сравнительный анализ экспрессии генов и степени активации сигнальных путей в образцах эутопического эндометрия 11 пациенток с НГЭ, у которых наступил рецидив в течение периода наблюдения, и образцах эутопического эндометрия 39 пациенток с НГЭ, у которых не

было выявлено рецидива.

Патоморфологическое исследование проводили по общепринятой методике в лаборатории кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета им А.И. Евдокимова (заведующий - д.м.н., профессор О.В. Зайратьянц). Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории компании «Омикслаб». Статистический анализ полученных результатов был проведен с использованием Python и пакета для научных вычислений SciPy, а также с помощью программы Stattech 2020. На этапе молекулярно-генетического исследования дополнительно использовался биоинформатический анализ. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводился также с использованием пакета DESeq2 (функция deseq). Статистический анализ результатов данного этапа исследования был проведен с использованием языка программирования R (версия 3.6.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ клинико-anamnestических данных пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Средний возраст пациенток с наружным генитальным эндометриозом составил 31.3 ± 6.3 года. Средний возраст женщин в группе сравнения составил 32.8 ± 4.9 лет.

Анализ временного интервала с момента дебюта симптомов до верификации диагноза посредством лапароскопии у пациенток исследуемой группы продемонстрировал, что от клинической манифестации до оперативного вмешательства прошло 17.5 месяцев.

При анализе наследственного анамнеза пациенток исследуемой группы было выявлено наличие НГЭ у родственников первой степени родства в 34% случаев (n=17).

При анализе репродуктивной функции пациенток данной группы было выявлено наличие беременности в анамнезе у 13 женщин (26%), завершившиеся самопроизвольными родами на доношенном сроке беременности во всех случаях. Первичное бесплодие было диагностировано у 15 пациенток с эндометриозом, вторичное бесплодие - у 3 пациенток, остальные 32 пациентки предохранялись от беременности.

Основной жалобой у 48 пациенток с НГЭ из 50 являлась тазовая боль: в 62 %

случаев (31 пациентка) отмечались циклические тянущие боли внизу живота, в 34 % (17 пациенток) - боли внизу живота, усиливающиеся при менструации (Рисунок 1). Среди жалоб данных пациенток также отмечались дисменорея у 39 (78%) женщин, диспареуния у 14 (28%), скудные межменструальные кровянистые выделения у 4 (8%) и отсутствие наступления беременности при регулярной половой жизни в течение минимум 1 года у 18 (36%) пациенток.



Рис. 1. Характеристика болевого синдрома у пациенток исследуемой группы.

Всем пациенткам, включенным в исследование, проводилось хирургическое лечение лапароскопическим доступом с последующим гистологическим исследованием биоматериала. У 26 пациенток (52%) исследуемой группы была диагностирована I/II стадия НГЭ по классификации r-AFS, у 24 пациенток (48%) - III/IV стадия. Среди пациенток с I/II стадией НГЭ у 20 женщин были выявлены эндометриоидные кисты яичников (двусторонние эндометриоидные кисты яичников у 1 пациентки), эндометриоз брюшины малого таза у 6 пациенток. Среди пациенток с III/IV стадией НГЭ у 2 женщин была выявлена распространенная форма наружного генитального эндометриоза, у 21 пациенток - эндометриоидные кисты яичников (двусторонние кисты яичников отмечались у 11 женщин), в 8 случаях - глубокий инфильтративный эндометриоз, у 14 женщин - спаечный процесс в малом тазу.

Средняя продолжительность операции при I/II стадии эндометриоза составила

54.2 ± 18,7 мин, при III/IV стадии – 83,3 ± 36,3 мин (p-value = 0.001). При сравнении средней продолжительности оперативного вмешательства у пациенток исследуемой группы и группы сравнения было выявлено, что средняя продолжительность операции при наружном генитальном эндометриозе составила 68.2 ± 31.8 мин, а при трубно-пеританеальном бесплодии – 39.9 ± 16.4 мин (p-value = 0.00000091).

Средняя интраоперационная кровопотеря у пациенток с III/IV стадией НГЭ составила 64.6 ± 43 мл, а у пациенток с I/II стадией НГЭ – 34.2 ± 28,3 мл (p-value = 0.006). При сравнении средней интраоперационной кровопотери у пациенток исследуемой группы и группы сравнения было выявлено, что средняя кровопотеря при оперативном лечении наружного генитального эндометриоза составила 48.8 ± 38.9 мл, а в случае трубно-пеританеальном бесплодия – 14.6 ± 10.8 мл (p-value = 0.00000018).

Послеоперационный период протекал без осложнений. Согласно показаниям проводилась профилактика венозных тромбоэмболических осложнений.

Диагноз наружный генитальный эндометриоз был подтвержден в ходе гистологического исследования у всех пациенток исследуемой группы. Патология эндометрия была исключена у всех пациенток, включенных в исследование.

Контрольный осмотр с УЗИ органов малого таза был назначен через 1 месяц после оперативного вмешательства. Все женщины находились под динамическим наблюдением в течение 2 лет. Особое внимание обращали на качество жизни женщин, предъявляемые жалобы, данные УЗИ органов малого таза.

За двухлетний период наблюдения за пациентками исследуемой группы после хирургического лечения НГЭ рецидивы данного заболевания были выявлены у 11 (22%) пациенток. Был проведен анализ зависимости риска рецидивирования от различных клиничко-anamnestических факторов. В результате анализа корреляции рецидивирования НГЭ в течение 2 лет и наследственной отягощенности по НГЭ не удалось выявить значимых различий (p = 0,151). Анализ зависимости наступления рецидива от суммы баллов по классификации r-AFS продемонстрировал, что у 11 пациенток, у которых за период наблюдения был выявлен рецидив НГЭ, сумма баллов по r-AFS составила более 46 единиц (46-77).

Молекулярно-генетическое исследование в рамках данной работы было проведено в несколько этапов. Для подтверждения возможности сравнения образцов

эутопического и эктопического эндометрия, все образцы были первоначально нормализованы на образцы эндометрия пациенток группы сравнения.

В результате сравнения образцов эутопического эндометрия пациенток с НГЭ (n=50) и без данного заболевания (n=35) было получено 17846 дифференциально экспрессирующихся генов (p-value < 0.05). Наиболее достоверная дифференциальная экспрессия наблюдалась у гена MTUS2-AS2, кодирующего длинную антисмысловую РНК к гену MTUS2, который кодирует белок, ассоциированный с микротрубочками. Было выявлено снижение экспрессии данного гена образцах эутопического эндометрия пациенток с НГЭ по сравнению с образцами эндометрия женщин группы сравнения.

Был проведен аналогичный дифференциальный анализ экспрессии генов и активации молекулярных путей в образцах эктопического эндометрия пациенток с НГЭ (n=64) с образцами эндометрия женщин группы сравнения (n=35). В результате анализа было выявлено 17501 дифференциальных генов, что в 1,67 раз большей выявленных дифференциальных генов на предыдущем этапе исследования. Среди дифференциальных генов наиболее достоверная разница была получена для гена C7, кодирующего ключевой элемент системы комплемента. Экспрессия данного гена в эктопических очагах эндометриоза значительно выше по сравнению с образцами группы сравнения.

Также при сравнении образцов эктопического эндометрия пациенток с НГЭ с образцами эндометрия женщин группы сравнения было выявлено 1416 дифференциально активированных сигнальных путей, что в 5,42 раза больше, чем было получено при сравнении эутопического и эктопического эндометрия пациенток с НГЭ. Наиболее достоверная дифференциальная активация наблюдалась для сигнального пути NCI_ Validated_transcriptional_targets_of_AP1_family_members_Fra1_and_Fra2_Main_Pathway, степень активации которого значительно снижена в очагах эндометриоза по сравнению с образцами эндометрия группы сравнения. Данный сигнальный путь включает в себя гены-мишени транскрипционных факторов Fra1 и Fra2, задействованных в регуляции пролиферации и дифференциации клеток.

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о высокой степени различий между эктопическим эндометрием пациенток с эндометриозом и

эндометрием пациенток группы сравнения по экспрессии генов и уровнях активации сигнальных путей.

На следующем этапе исследования было выполнено сравнение образцов эутопического (n=50) и эктопического (n=64) эндометрия пациенток с НГЭ. Сравнение проводилось как между группами образцов, так и отдельно для каждой пациентки. В результате сравнения указанных групп образцов было получено 10498 дифференциально экспрессированных генов, что в 1.7 раз меньше, чем количество дифференциально экспрессированных генов в образцах эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом и пациенток группы сравнения. Данный факт свидетельствует о более выраженных различиях в экспрессии генов между эутопическим эндометрием пациенток с эндометриозом и эндометрием женщин группы сравнения. Наиболее достоверная разница в экспрессии наблюдалась для гена LINC01502. Экспрессия данного гена значительно повышена в образцах эктопического эндометрия по сравнению с образцами эутопического эндометрия тех же пациенток с НГЭ.

В результате сравнения степени активации сигнальных путей в образцах эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом и образцах эндометрия женщин группы сравнения было получено 1475 дифференциально активированных сигнальных путей. Интересно отметить, что в результате аналогичного сравнительного анализа образцов эутопического и эктопического эндометрия пациенток с эндометриозом был получен только 261 дифференциально активированный сигнальный путь.

Как и в случае сравнительного анализа группы образцов эутопического эндометрия и группы образцов эктопического эндометрия тех же пациенток, при попарном анализе образцов эутопического и эктопического эндометрия для каждой из пациенток среди дифференциально активированных сигнальных путей наибольшая достоверность была также получена при анализе активации пути `reactome_Smooth_Muscle_Contraction_Main_Pathway`. Активация данного сигнального пути повышена в эктопическом эндометрии пациенток с НГЭ по сравнению с эутопическим эндометрием тех же пациенток.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженных различиях в экспрессии генов и степени активации сигнальных путей в образцах эутопического

эндометрия пациенток с НГЭ и эндометрия пациенток, не имеющих данного заболевания. В то же время было выявлено гораздо меньше дифференциально экспрессированных генов и дифференциально активированных сигнальных путей при сравнении образцов эутопического и эктопического эндометрия пациенток с эндометриозом. Указанные факторы, а также наличие высокой степени корреляции между молекулярно-генетическими изменениями в образцах эутопического и эктопического эндометрия пациенток с НГЭ, обуславливают потенциальную эффективность анализа эутопического эндометрия с целью диагностики НГЭ.

Для создания генной подписи, способной к эффективной ранней диагностике эндометриоза по анализу образца эндометрия, на основании данных о дифференциальной экспрессии DESeq2 мы разработали процедуру машинного обучения, включающую идентификацию дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ), специфичных для образцов эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом и очагов эндометриоза в сравнении с образцами эндометрия пациенток группы сравнения. Данная процедура машинного обучения включает две стадии. Во-первых, выделяются ДЭГ на основании сравнения между образцами эутопического эндометрия пациенток с НГЭ и женщин группы сравнения. Во-вторых, отбираются гены предварительной генной подписи с наибольшей величиной AUC для разделения между образцами очагов НГЭ и образцами эндометрия пациенток группы сравнения. Подобная процедура привела к получению сравнительно небольших наборов ДЭГ (5-18 генов), а последующая 5-кратная кросс-валидация продемонстрировала высокую предсказательную силу предварительных генных подписей (значения AUC в интервале 0.95-1), которая соответствует современным стандартам молекулярной диагностики.

Было проанализировано сходство между полученными пятью подписями генной экспрессии, что привело к созданию итоговой генной подписи эндометрия при НГЭ, включающей 5 генов, экспрессия которых снижена в образцах эутопического и эктопического эндометрия пациенток с НГЭ (Рисунок 2).

Номер итерации	Активированные гены	Ингибированные гены
Предварительные «генные подписи»		
1		<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF, RPS11, NCOR2</i>
2		<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF, RPS11, NCOR2, LY6D, RACK1</i>
3		<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF</i>
4	<i>ZC2HC1A, EGLN1, PHC3, KRIT1, COMMD8</i>	<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF, RPS11, NCOR2, LY6D, RACK1, EMP1, MYADM, SERPINE1, TRIM29</i>
5	<i>ZC2HC1A, EGLN1, PHC3, KRIT1, COMMD8</i>	<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF, RPS11, NCOR2, LY6D, RACK1, EMP1, MYADM, SERPINE1, TRIM29</i>
Итоговая «генная подпись»		
		<i>LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF</i>

Рис. 2. Предварительные генные подписи и итоговая генная подпись.

Для валидации итоговой генной подписи был создан набор данных генной экспрессии из всех образцов пациенток с НГЭ (всего 114 образцов) и всех образцов пациенток группы сравнения (всего 35 образцов) (Рисунок 3).



Рис. 3. Схема 5-кратной кросс-валидации, использованной в данном исследовании.

Величина AUC для дифференциации исследуемых образцов составила 0.982, что показывает практически полное разделение образцов разных групп (Рисунок 4).

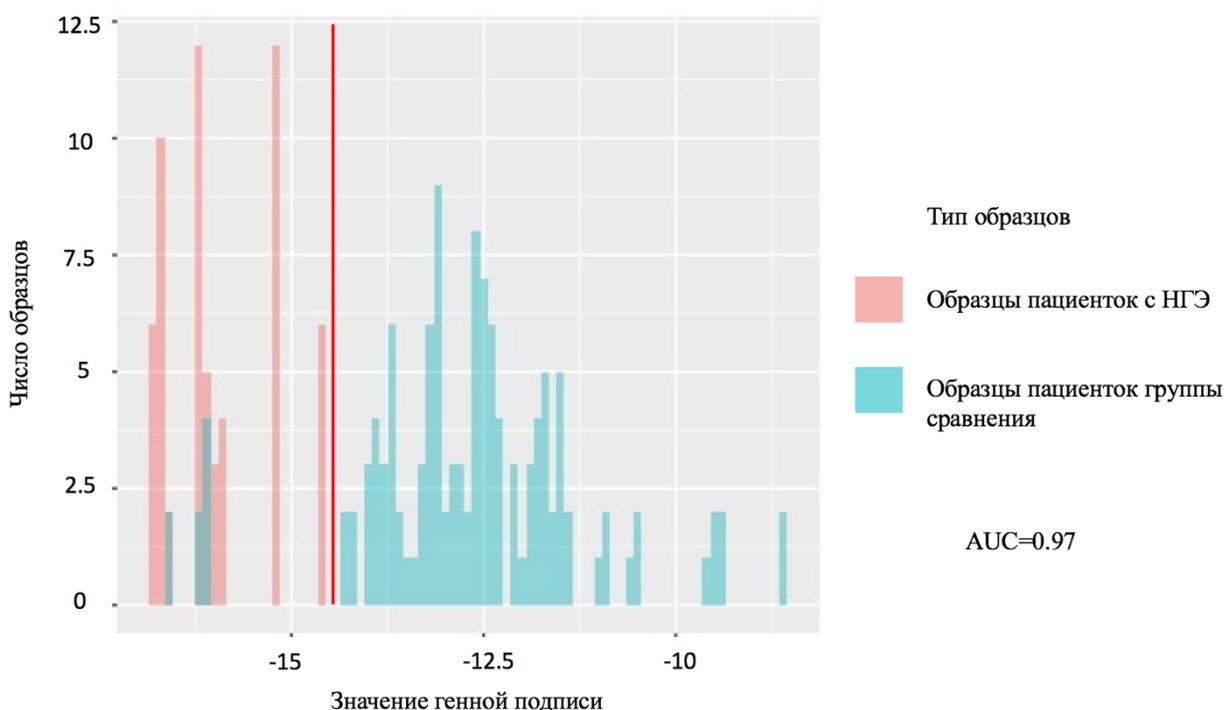


Рис. 4. Распределение значения 5-генной подписи для 114 образцов, полученных от пациенток с НГЭ, и 35 образцов эндометрия пациенток группы сравнения. Пороговая величина отмечена красной линией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что генная подпись, состоящая из генов LMNA, KDM6B, CIC, PER1 и PPDPF, эффективно дифференцирует образцы эндометрия в зависимости от наличия или отсутствия эндометриоза у конкретной пациентки.

Для выявления молекулярно-генетических факторов риска рецидивирования НГЭ был проведен сравнительный анализ данных РНК-секвенирования образцов эутопического эндометрия пациенток с НГЭ, у которых в последующем наступил рецидив, с образцами эутопического эндометрия пациенток с НГЭ, у которых не было диагностировано рецидива за дв ухлетний период наблюдения. Наиболее статистически значимой оказалась дифференциальная экспрессия генов PSMB2, TANC1, EXOSC6, OGFOD1. Экспрессия генов PSMB2, EXOSC6 и OGFOD1 значительно снижена, а экспрессия гена TANC1, наоборот, повышена в эутопическом эндометрии пациенток с НГЭ, у которых в последующем наблюдался рецидив данного заболевания.

Интересно отметить роль данных дифференциально экспрессирующихся генов: ген PSMB2 кодирует компонент протеасомы (системы деградации белков); ген EXOSC6

кодирует компонент экзосомы, осуществляющей деградацию мРНК; ген OGFOD1 кодирует белок, задействованный в связывании ионов железа и оксидоредуктазной активности в клетке; ген TANC1 кодирует белок, являющийся каркасным компонентом постсинаптической мембраны.

Значительное снижение экспрессии генов PSMB2, EXOSC6 и OGFOD1, выявленное в эутопическом эндометрии пациенток, у которых в последующем наступил рецидив НГЭ, может способствовать снижению эффективности процессов деградации клеточных компонентов и мРНК, что потенциально может привести к повышению выживаемости клеток в очагах эндометриоза.

На уровне сигнальных путей была отмечено повышение степени активации пути Cellular-Apoptosis-Pathway-Gene-Expression-FLIP-CIAP2-BFL1-BCL2-via-NFKB2 в эутопическом эндометрии пациенток с НГЭ, у которых в последующем наблюдался рецидив заболевания. Данный путь представляет собой ветвь пути апоптоза, которая отвечает за повышение экспрессии генов FLIP, CIAP2, BFL2 и BCL2 при помощи транскрипционного фактора NF-κB. Белок BCL2 является ингибитором проапоптотических факторов в клетке, а белок cIAP2 подавляет процесс апоптоза посредством прямого ингибирования проапоптотической каспазы-3 и способствует выживанию клетки посредством активации сигнального пути фактора некроза опухоли альфа (TNF-α). Белок c-FLIP задействован в ингибировании процессов апоптоза, некроптоза и аутофагии. В клетках эндометрия пациенток с эндометриозом, у которых в последующем произошел рецидив данного заболевания, наблюдается выраженная супрессия апоптоза, что вероятно способствует выживанию клеток в последствие ретроградной менструации и формированию очагов эндометриоза.

Таким образом, анализ экспрессии генов PSMB2, TANC1, EXOSC6, OGFOD1 и степени активации сигнального пути Cellular-Apoptosis-Pathway-Gene-Expression-FLIP-CIAP2-BFL1-BCL2-via-NFKB2 в образцах эутопического эндометрия может потенциально прогнозировать вероятность наступления рецидива.

ВЫВОДЫ

1. Частота наступления рецидива наружного генитального эндометриоза после оперативного лечения в течение 2 лет наблюдения составляет 22,0%. К факторам риска рецидивирования наружного генитального эндометриоза относятся III/IV стадия НГЭ, сумма баллов по классификации r-AFS > 46.
2. Методами РНК-секвенирования и биоинформатического анализа выявлена высокая степень корреляции между показателями экспрессии генов и активации внутриклеточных сигнальных путей в образцах эутопического и эктопического эндометрия пациенток с наружным генитальным эндометриозом, что свидетельствует о наличии значительных молекулярно-генетических изменений в эндометрии, характеризующих данную патологию.
3. Определена молекулярно-генетическая характеристика эндометрия при наружном генитальном эндометриозе – так называемая генная подпись, включающая 5 генов (LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PPDPF), которая достоверно различает образцы эутопического эндометрия пациенток с эндометриозом и женщин, не имеющих данного заболевания: ее прогностическая сила составляет $AUC > 0,95$; чувствительность 82%; специфичность 100%.
4. Установлено, что анализ экспрессии генов PSMB2, TANC1, EXOSC6, OGFOD1 и степени активации сигнального пути Cellular-Apoptosis-Pathway-Gene-Expression-FLIP-CIAP2-BFL1-BCL2-via-NFKB2 в образце эутопического эндометрия эффективно прогнозирует риск рецидивирования наружного генитального эндометриоза после хирургического лечения.
5. Высокая диагностическая и прогностическая значимость выявленных генетических маркеров обуславливает потенциальную эффективность их применения для ранней диагностики наружного генитального эндометриоза, предикции высокого риска рецидивирования заболевания и оптимизации тактики ведения пациенток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наличии хронической тазовой боли, отягощенного семейного анамнеза по наружному генитальному эндометриозу и бесплодия неясного генеза необходимо информировать женщин о вероятности выявления у них наружного генитального эндометриоза, что позволит повысить приверженность к диспансерному наблюдению и своевременному посещению акушера-гинеколога.
2. В качестве малоинвазивной диагностики наружного генитального эндометриоза в клинической практике может быть использована аспирационная биопсия эндометрия с последующим применением генетической подписи, состоящей из генов LMNA, KDM6B, CIC, PER1, PDPF. Данный подход позволит проводить скрининг пациенток группы высокого риска развития эндометриоза с целью своевременной диагностики НГЭ, осведомления женщин о диагнозе и принятии решения о тактике ведения пациенток в зависимости от клинических проявлений и заинтересованности пациентки в реализации репродуктивной функции.
3. При хирургическом лечении пациенткам может быть рекомендовано проведение анализа экспрессии генов PSMB2, TANC1, EXOSC6 OGFOD1 и степени активации сигнального пути Cellular-Apoptosis-Pathway-Gene-Expression-FLIP-CIAP2-BFL1-BCL2-via-NFKB2 в образце эндометрия с целью прогнозирования риска рецидивирования, что позволит оптимизировать тактику ведения пациенток после операции и рекомендовать сроки для реализации репродуктивной функции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза // **Проблемы репродукции.** – 2015. – Т. 21, №2. – С. 66-77.
2. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б. Биомаркеры эндометриоза – современные тенденции // **Проблемы репродукции.** – 2018. – Т. 24, №1. – С. 57-62.
3. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б., Осипова А.А. Сравнительная характеристика эндометрия при эндометриозе и в отсутствие данного заболевания // **Проблемы репродукции.** – 2018. – Т. 24, №3. – С. 10-15.
4. Азнаурова Я.Б., Петров И.В., Сунцова М.В., Гаража А.В., Буздин А.А., Адамян Л.В. Взаимосвязь экспрессии генов и степени активации сигнальных путей в эндометрии

- и эктопическом эндометрии пациенток с наружным генитальным эндометриозом // **Проблемы репродукции.** – 2018. – Т. 24, №4. – С. 13-21.
5. Адамян Л.В., Осипова А.А., Азнаурова Я.Б., Сонова М.М., Петров И.В., Сунцова М.В., Буздин А.А. Анализ экспрессии генов и активации сигнальных путей в эутопическом и эктопическом эндометрии пациенток с наружным генитальным эндометриозом // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** – 2019. – Т. 18, №1. – С. 6-10.
6. Aznaurova Y.B. Interconnection between eutopic and ectopic endometrium on gene expression and signalling pathways levels / Aznaurova Y.B., Garazha A.V., Buzdin A.A., Adamyan L.V. // Abstracts from the ISGE World Congress, Gynecological Endocrinology. – 2016. – V. 32, №1. – P. 86.
7. Aznaurova Y.B. Interconnection between eutopic and ectopic endometrium on signaling pathways level / Aznaurova Y.B., Garazha A.V., Adamyan L.V., Buzdin A.A., Stepanian A.A. // Supplement to the Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2016. – V. 23, №7. – P. 24.
8. Азнаурова Я .Б., Гаража А .В., Буздин А .А., Адамян Л .В. Корреляция степени активации внутриклеточных сигнальных путей в эу- и эктопическом эндометрии // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине. – 2017. – С. 24-25.
9. Азнаурова Я.Б., Сунцова М.В., Аракелян А .С., Буздин А .А., Адамян Л .В. Анализ активности сигнальных путей в эу- и эктопическом эндометрии // Материалы XXX Юбилейного международного конгресса с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний». – 2017. – С. 145-146.
10. Aznaurova Y.B. The similarity of the eutopic and ectopic endometrium in transcriptomic profiles / Aznaurova Y.B., Garazha A.V., Adamyan L.V., Buzdin A.A., Stepanian A.A. // Supplement to the Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2017. – V. 24, №7. – P. 15.
11. Азнаурова Я .Б., Сунцова М.В., Аракелян А .С., Буздин А .А., Адамян Л .В. Анализ транскриптомного профиля и активности сигнальных путей в эутопическом и эктопическом эндометрии пациенток с эндометриозом // Материалы XII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – 2018. – С. 129-130.
12. Азнаурова Я .Б., Сунцова М.В., Буздин А .А., Адамян Л .В. Сравнительная характеристика транскриптомного профиля эутопического и эктопического

- эндометрия // Материалы XXXI Международного конгресса с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний». – 2018. – С. 9-10.
13. Aznaurova Y.B. Molecular signature of endometrial samples from women with and without endometriosis / Aznaurova Y.B., Adamyan L.V., Garazha A.V., Buzdin AA., Stepanian A.A. // Supplement to the Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2018. – V. 25, №7. – P. 74.
14. Aznaurova Y.B. Gene Expression Signature in Diagnosis of Endometriosis / Aznaurova Y.B., Adamyan L.V., Stepanian A.A., Garazha A.V., Buzdin A.A. // Supplement to the Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2019. – V. 26, №7. – P. 4-5.
15. Aznaurova Y.B. Validation of Five Gene Expression Signature for Diagnosis of Endometriosis / Aznaurova Y.B., Adamyan L.V., Stepanian A.A., Nikitin D.M., Garazha A.V., Buzdin A.A. // Supplement to the Journal of Minimally Invasive Gynecology. – 2020. – V. 27, №7. – P. 7.

Подписано в печать 24.03.2021 г.
Формат А5 Бумага офсетная. Печать цифровая.
Тираж 100 Экз. Заказ № 89461
Типография ООО «Впечатать»
127051, г. Москва, 2-й Колобовский переулок, д. 9/2 стр. 1