

На правах рукописи

Куликова Наталья Владимировна

**РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ
НЕОАНГИОГЕНЕЗА, ГЕЛЬОБРАЗУЮЩЕГО МУЦИНА
И ФЕРМЕНТА МЕТАБОЛИЗМА АНДРОГЕНОВ В РАЗВИТИИ
ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Научный консультант:
доктор медицинских наук, доцент

Шперлинг Наталья Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник отдела
лабораторной диагностики ФГБУ
«Всероссийский центр экстренной и
радиационной медицины имени А.М.
Никифорова» МЧС России

Калинина Наталия Михайловна

доктор медицинских наук, ассистент
кафедры акушерства и гинекологии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Кублинский Константин Сергеевич

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» (г. Саранск)

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Эндометриоз является сложным, многоцентровым, рецидивирующим, дисгормональным, иммунозависимым и генетически детерминированным заболеванием, для которого характерно эктопическое расположение вне полости матки ткани, схожей морфологически и функционально с эндометрием [Баранов В.С., 2018; Межлумова Н.А. и др., 2018; Маржевская В.В. и др., 2018; Шалина М.А. и др., 2020; Angioni S. et al., 2020]. Эндометриозом страдают около 176 млн женщин в мире, из которых фертильными остаются не более 60% [Коган Е.А. и др., 2017]. Разнообразие клинических проявлений и локализаций эндометриоза снижает процент раннего выявления заболевания и своевременной постановки диагноза. В случае установленного диагноза и проведения комплексного лечения, частота вынашивания беременностей у данной категории пациенток, спонтанно или с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, составляет не более 50-70% [Vassiliadis S., 2010; Гончарова М.А. др., 2020].

Известно, что эндометриоз негативно влияет на качество жизни пациенток, в том числе, большинство пациенток отмечают склонность к депрессии. Однако, ассоциировать психологический портрет пациенток с риском развития эндометриоза на данный момент не удалось [Polisseni F. et al., 2003; Ahn S.H. et al., 2015; Баранов В.С., 2017; Кублинский К.С., 2018; Маржевская В.В. и др., 2018; Moreno I. et al., 2018; Менжинская И.В. и др., 2020]. Эндометриоз встречается среди пациенток различного возраста; наиболее часто обнаруживается у женщин репродуктивного возраста. Описаны случаи эндометриоза у девочек до начала менархе [Gogacz M. et al., 2012; Майорова А.М.В. и др., 2019] и у женщин в менопаузе [Polisseni F. et al., 2003; Mansour G. et al., 2010].

В настоящее время, наиболее приемлемой теорией возникновения эндометриоза является гипотеза Сэмпсона о ретроградной менструации, которая предполагает, что во время менструации эндометриальные эмболы мигрируют через фаллопиевы трубы и венозную сеть в брюшную полость или другие органы, где они способны прикрепляться, выживать и имплантироваться [Morotti M., et al., 2014].

Эндометриоз – заболевание, имеющее наследственную предрасположенность, на развитие которого влияют многочисленные факторы, в том числе, генетические и экологические, хотя точная геномная основа эндометриоза не ясна. Общая наследственность эндометриоза оценивается примерно в 50%, но точный механизм развития этой патологии не определен [Пономаренко И.В. и др., 2019]. Предположение о возможности генетической предрасположенности эндометриоза основано на отдельных генеалогических исследованиях [Zubrzuska A. et al., 2020]. Клинические случаи возникновения эндометриоза у монозиготных близнецов позволили выявить высокую (относительно среднестатистической) экспрессию генов человеческого лейкоцитарного антигена, интерферона гамма (IFN- γ), интегринов и интерлейкина-6 (IL-6) [Lin Y.H. et al., 2018]. При проведении крупномасштабного исследования, посвящённого генетическому анализу более 300 случаев наследственного эндометриоза было выявлено, что при данном заболевании преобладает аутосомно -

доминантный тип наследования [Burney R.O. et al., 2007; Liu S. et al., 2016; Giampaolino P. et al., 2020]. Следовательно, можно предположить, что эндометриоз ассоциирован с экспрессией дефектных генов в результате мутаций.

Степень разработанности темы. При эндометриозе прогностическое значение имеют полиморфные варианты и мутации генов-маркеров апоптоза, ангиогенеза, пролиферации. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным медиатором ангиогенеза, индуцирующим новообразование, миграцию, дифференцировку и пролиферацию эндотелиальных клеток капилляров и вносящем вклад в патогенез и прогрессирование эндометриоза [Melincovici C.S. et al., 2018; Nanda A. et al., 2020; Yovich J.L. et al., 2020]. Известно, что при гиперэстрогемии VEGF секретируется эпителиальными и стромальными клетками матки [Ushio-Fukai M. et al., 2004; Czyzyk A. et al., 2017]. VEGF был выделен в эндометриальных гетеротопиях и перитонеальной жидкости у пациенток с эндометриозом [McLaren J. et al., 1996].

Большая часть эстрогенов синтезируется в theca - клетках яичников, иной механизм синтеза эстрогенов осуществляется посредством ароматизации андрогенов в надпочечниках и печени [Haldar M. et al., 2014; Иващенко Т.Э. и др., 2019; Colón-Caraballo M. et al., 2019]. Несмотря на то, что роль андрогенов в патогенезе эндометриоза не изучена, в нормально расположенном и гетеротопном эндометрии определяются рецепторы к андрогенам [Soriano D. et al., 2012; Garcia-Velasco J. et al., 2015]. Биосинтез всех стероидных гормонов происходит посредством реакций гидроксирования, специфичность которых определяется белком цитохрома P450. Ген *CYP11B2*, кодирующий выработку ферментов цитохрома P450, локализуется на митохондриальной внутренней мембране, обладает стероидной 18-гидроксилазной активностью для синтеза альдостерона и 18-оксикортизола, а также стероидной 11-бета-гидроксилазной активностью. Мутации в этом гене вызывают дефицит кортикостеронметилоксидазы [Cavalcanti V. et al., 2016; Jiang J. et al., 2019].

В механизме защиты эндометрия, в том числе и эктопичного, участвуют гельобразующие муцины (в частности, MUC 2), с помощью образования вязко-эластичного слоя с высокой молекулярной массой. Одним из таких компонентов слизи является MUC 2; данный гликопротеин синтезируется бокаловидными эндокриноцитами в фазу секреции [Omwandho C. et al., 2010; Wagener K. et al., 2017]. Установлено, что нарушение секреции муцинов (MUC 1, MUC 4, MUC 16) является предиктором эндометриоз-ассоциированного бесплодия [Feghali J. et al., 2003; Cavalcanti V. et al., 2016]. Связь полиморфизмов rs10794288 и rs10902088 гена *MUC2* с развитием эндометриоза у женщин, проживающих на территории Тайваня, была доказана в 2012 году [Takebayashi A. et al., 2014].

Приведенные выше данные литературы о связи полиморфизмов обозначенных генов с развитием эндометриоза не являются неопровержимыми. Дальнейший анализ значения генетических факторов в этиологии эндометриоза играет ведущую роль в диагностике, определении индивидуального риска и разработке новых терапевтических направлений в лечении данного заболевания. Не исключено, что генетические факторы опосредованно влияют на развитие эндометриоза, посредством врожденных аномалий развития репродуктивной системы и нарушения иммунного гомеостаза.

Поиск маркеров предрасположенности к генитальному эндометриозу среди аллелей генов *VEGF*, *MUC 2* и *CYP11B2* – новый, перспективный раздел исследований, способный идентифицировать группы риска развития и неблагоприятного течения данного заболевания. Роль полиморфных вариантов генов *VEGF-A*, *MUC2* и *CYP11B2* в патогенезе генитального эндометриоза раскрыта недостаточно, что актуализирует необходимость проведения настоящего исследования.

Целью исследования явилось изучение вклада полиморфных вариантов генов неоангиогенеза *VEGF-A*, гельобразующего муцина *MUC2* и фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* в развитие генитального эндометриоза и особенности его течения.

Задачи исследования:

1. Провести анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов неоангиогенеза *VEGF-A* (C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039)), гельобразующего муцина *MUC2* (C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288)) и фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* (C(-344)T (rs1799998)) с риском развития генитального эндометриоза.
2. Исследовать взаимосвязи полиморфных вариантов гена неоангиогенеза *VEGF-A* C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) с содержанием фактора VEGF-A в крови у женщин с генитальным эндометриозом.
3. Установить вклад полиморфных вариантов генов *VEGF-A*, *MUC 2* и *CYP11B2* в развитие клинических симптомов при генитальном эндометриозе.

Положения, выносимые на защиту

1. К развитию генитального эндометриоза у женщин предрасполагает носительство полиморфных вариантов генов ангиогенеза *VEGF-A* C(+936)T (rs3025039) (аллеля С и генотипов СС), фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) (генотипов ТТ). Полиморфизмы генов неоангиогенеза *VEGF-A* C(-460)T (rs833061) (генотип ТТ), C(+936)T (rs3025039) (аллель Т и генотип ТТ), гельобразующих муцинов *MUC2* T(-12150)C (rs10794288) (генотип СС) и фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) (генотип СС) ассоциированы с пониженным риском развития генитального эндометриоза.
2. Концентрация цитокина VEGF-A в крови у пациенток с генитальным эндометриозом по всем генотипам локуса C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* ниже, чем у женщин без эндометриоза.
3. При генитальном эндометриозе у женщин к развитию диспареунии и дисхезии предрасполагают полиморфизмы T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* и C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2*. Образование эндометриом ассоциировано с носительством генотипа СС и аллеля С полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A*.

Научная новизна

С привлечением широкого комплекса современных методов исследования было проведено изучение функциональной активности генов *VEGF-A*, *CYP11B2* и *MUC2*, вовлеченных в регуляцию процессов развития эндометриоза. Впервые были выявлены полиморфизмы генов неоангиогенеза *VEGF-A* C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039), гелеобразующих муцинов *MUC2* C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288) и ферментов метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998), ассоциированные с риском развития генитального эндометриоза. Впервые установлена связь полиморфизмов T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* и C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с развитием клинических симптомов и форм генитального эндометриоза у женщин. Приоритетными являются данные, свидетельствующие о патогенетической связи хронического эндометрита с эндометриозом у пациенток Северо-Западного федерального округа России.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость:

Получены знания фундаментального характера о предрасполагающей роли полиморфных вариантов генов неоангиогенеза *VEGF-A*, гелеобразующего муцина *MUC2* и фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* к развитию и особенностям течения генитального эндометриоза.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью поиска новых точек воздействия в профилактике, прогностике и лечении репродуктивных заболеваний, выявлении факторов риска их возникновения. Результаты исследования могут послужить базисом для создания панели иммуногенетических маркеров, с целью эффективной доклинической диагностики, выбора рациональной тактики ведения пациенток с генитальным эндометриозом, а также предупреждения развития заболевания у лиц с отягощенным семейным анамнезом.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной медицины медицинского института и Института Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда, а также в практику Клиники Высоких Технологий им. Н.И. Пирогова СПбГУ г. Санкт-Петербурга.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на базе Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, с использованием высокопроизводительных и высокотехнологичных методов исследования.

Материалом исследования являлась венозная кровь и биоптаты эндометрия, взятые у пациенток, принявших участие в исследовании (пациентки с гистологически установленным генитальным эндометриозом и группа сравнения (пациентки, не имеющие очагов эндометриоза при проведении лапароскопии).

Основные методы исследования:

1. Клинико-диагностические. При первичном обращении проводился сбор анамнеза, общеклинический и гинекологический бимануальный осмотр. На 5-7 день

менструального цикла проводилось ультразвуковое исследование органов малого таза и магнитно-резонансная томография органов малого таза.

2. Все материалы, полученные в ходе оперативного лечения, направлялись на гистологическое исследование.

3. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

4. Методом иммуноферментного анализа оценивали содержание ангиогенного цитокина VEGF-A в крови.

5. Статистический анализ полученных данных. Полученные данные подвергались обработке с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 26 для Windows.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокую степень достоверности полученных результатов подтверждает достаточный объем клинико-экспериментального материала, применение современных методов исследования (диагностических, иммунологических, молекулярно-генетических), используемые методические подходы, высокотехнологичное оборудование, а также адекватные критерии статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на симпозиуме «Репродуктивное здоровье женщины в фокусе внимания» (Санкт-Петербург, 2017), III-м Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017), дискуссионном клубе «Инфильтративный эндометриоз: сложности диагностики и перспективы комбинированного лечения» (Санкт-Петербург, 2017), II-м научном конгрессе с международным участием «Инновации в акушерстве, гинекологии и репродуктологии» (г. Санкт-Петербург, 2019), XIV Международном конгрессе по репродуктивной медицине (г. Москва, 2020). Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (16-15-10031), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2495.2020.7) и Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

Публикации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 печатных работах, в том числе: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, 2 статьи по материалам конференций, 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 2 рисунками и 33 таблицами. Библиографический указатель включает 168 источника (122 – иностранных и 46 – отечественных).

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в разработке дизайна и планировании исследования, лично проводил пробоподготовку и лабораторные исследования биоматериала. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В исследование были включены 164 пациентки репродуктивного возраста. Из них: 85 пациенток с гистологически установленным генитальным эндометриозом ($31,5 \pm 12,5$ лет) - группа 1, и 79 женщин без эндометриоза - группа 2 (группа сравнения; пациентки, не имеющие очагов эндометриоза при проведении лапароскопии), сопоставимых по возрасту с 1-й группой женщин ($31,0 \pm 11,0$ лет). Все женщины, включенные в исследование, фенотипически являлись представительницами славянской популяции. Все участницы исследования длительное время проживали на территории Северо-Западного федерального округа России. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

План и дизайн исследования согласованы и одобрены комиссией по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта: №2 от 02.03.2018.

Диагноз был верифицирован в ходе проведенного хирургического лечения и подтвержден морфологически. Согласно пересмотренной классификации Американского Общества Фертильности (R-AFS/ASRM), исходя из суммы баллов, была установлена степень тяжести эндометриоза.

Был изучен анамнез пациенток, выявлены жалобы и соматическая патология. Всем пациенткам до хирургического вмешательства проводился общеклинический и гинекологический бимануальный осмотр, ультразвуковое исследование органов малого таза на 5-7 день менструального цикла различными доступами (трансвагинально, трансректально и трансабдоминально). С целью верификации тяжести процесса проводилась магнитно-резонансная томография органов малого таза на 5-7 день менструального цикла. Пациенткам с инфильтративными формами эндометриоза проводилась видеофиброколоноскопия, фиброгастроскопия.

В группу сравнения (группа 2) включены пациентки, у которых в ходе хирургического вмешательства по поводу подозрения на эндометриоз-ассоциированное бесплодие, проведения хирургической стерилизации, а также по экстренным показаниям (апоплексия или перекрут яичника, внематочная беременность) очаги эндометриоза обнаружены не были.

Во всех группах был отмечен одинаковый возраст наступления менархе $13,0 \pm 2,0$ лет ($p > 0,05$). У пациенток с эндометриозом, как и у женщин без него, менструальный цикл составлял в среднем 28 дней (25-31 день) ($p > 0,05$). В 97% случаев менструальный цикл был регулярным, у пациенток с эндометриозом в 42,2% случаев менструации были обильными и длительными ($p < 0,05$), в 8,2% случаев отмечались межменструальные кровотечения ($p < 0,05$).

Также пациентки с генитальным эндометриозом отмечали болевой синдром, связанный с менструацией в 77,6 % случаев, 40% женщин отмечали диспареунию, невынашивание беременности встречалось в 7,1 % случаев. У 20,0% пациенток с эндометриозом роды были через естественные родовые пути, с помощью кесарева сечения – у 7,1%, статистически значимые различия не выявлены ($p>0,05$). Оценка индекса массы тела (ИМТ) показала, что в основной группе пациенток с избыточной массой тела было 17% (10 человек), а в группе сравнения – 22% (17 человек); $\chi^2=0,69$, $p=0,41$. Распространённость ожирения была выше среди женщин без эндометриоза.

Во время лапароскопии у 85,9% пациенток выявлялись эндометриозные кисты; у 43,0% женщин они были двусторонними. Распространённость ретроцервикального эндометриоза составила 15,3%. Частота встречаемости симптомов среди пациенток с генитальным эндометриозом в зависимости от степени тяжести эндометриоза представлена в таблице 1. В ходе анализа гистологических исследований эндометрия у пациенток исследуемых групп было установлено, что хронический эндометрит обнаруживался в 80,5% случаев в группе пациенток, страдающих генитальным эндометриозом и в 1,2% - среди группы сравнения ($p = 0,001$) (табл. 2).

Таблица 1 - Частота встречаемости основных симптомов у пациенток с генитальным эндометриозом в зависимости от тяжести заболевания (R-AFS, 1985 г.), абс. (%)

Показатель	Пациентки с генитальным эндометриозом		P*
	I-II ст. (n=9)	III-IV ст. (n=76)	
Дисменорея	3 (33,3)	63 (82,9)	$p<0,05$
Диспареуния	0	34 (44,7)	$p<0,001$
Дисхезия	0	14 (18,4)	$p<0,001$
Объем менструации:			
Умеренные	6 (66,7)	36 (47,4)	$p<0,001$
Обильные	3 (33,3)	33 (43,4)	
Межменструальные кровотечения	0	7 (9,2)	$p<0,001$

Примечание: *согласно точному критерию Фишера

Критерии включения

В настоящее исследование включались женщины репродуктивного возраста (18-45 лет) с диагнозом генитального эндометриоза, верифицированным гистологически. Также критерием включения являлось подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения

Из исследования исключались женщины моложе 18 и старше 45 лет с наличием аллергических и острых воспалительных заболеваний различных локализаций, четко ассоциированных с возбудителями, в том числе

гинекологических; экстрагенитальных соматических заболеваний в стадии декомпенсации, онкологических заболеваний, имеющих в анамнезе, наследственные, психические заболеваниями, с наличием алкогольной и наркотической зависимости.

Таблица 2 - Распространенность патологии эндометрия в исследуемых группах

Патология эндометрия	Пролиферативный/ секреторный эндометрий	Хронический эндометрит	Гиперплазия эндометрия	P*
Группа сравнения (n=79)	73 (92,4%)	1 (1,2%)	5 (6,3%)	<0,001
Пациентки с генитальным эндометриозом (n=85)	11 (12,9%)	68 (80,5%)	6 (7,05%)	<0,001

Примечание: *согласно точному критерию Фишера

Биологический материал (удаленные участки тканей оперированных органов), полученный во время оперативного вмешательства, был фиксирован с помощью 10 % раствора нейтрального формалина в стерильной емкости. Далее материал был промаркирован, и имел направление с указанием паспортных данных пациентки, клинического диагноза, объема хирургического вмешательства, даты забора материала, номера истории болезни, описания исследуемых ткани или органа, а также дополнительных данных (сопутствующая гормональная терапия). После чего был направлен для гистологического исследования в национальный центр клинической морфологической диагностики, (г. Санкт-Петербург, ул. О.Дундича, д. 8, к2, лит. А, директор лаборатории - Воробьев Сергей Леонидович). После доставки материала в патологоанатомическое отделение, врач-патологоанатом проводил макроскопическое описание поступившего материала (органа, ткани). Ткани обезжиривались и заливались парафином для приготовления срезов исследуемых органов и тканей. Срезы толщиной 5 мкм окрашивались по Ван-Гизону и гематоксилин-эозином. Морфологическое исследование полученных препаратов проводили с помощью световой микроскопии при увеличении от 40 до 250.

Материалом для молекулярно-генетических и иммунологических исследований служила венозная кровь, взятая интраоперационно из локтевой вены; кровь отбирали в вакуумные пробирки Vacuette с активатором образования сгустка для получения сыворотки или ЭДТА для получения плазмы крови.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови, стабилизированной ЭДТА, согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол» Россия). Протокол выделения ДНК: вносили образец и маркировали необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения. Во все пробирки (с исключением отрицательного контроля) вносилось по 0,3 мл цельной крови, и затем 0,9 мл лизирующего раствора 1. Методом переворачивания (8-10 раз) содержимое

смешивали. Инкубировали смесь 10 минут, далее 2 минуты центрифугировали при скорости 13 000 об/мин.

Для лизиса ядерной мембраны лейкоцитов в пробирки типа «эппендорф» добавлялось по 0,3 мл Лизирующего раствора 2 (№2) с перемешиванием на вортексе или пипетированием. Для лизиса клеток смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Осаждали ДНК путем добавления к лизату 100 мкл Осаждающего раствора 1 (№3). Степень очистки препаратов ДНК определяли отношением поглощения света при длине волны 260 и 280 нм (A260/280). Полученные значения находились в диапазоне до 1,6-2,0 усл.ед.

Генотипирование осуществлялось методом ПЦР с использованием амплификатора LightCycler 480 Instrument II («Roche», Швейцария) и CFX96 («BioRad», США) и наборов для определения полиморфизмов *VEGF-A* T(-460)C (rs833061), *VEGF* C(+936)T (rs3025039), *CYP11B2* T(-344)C (rs1799998), *MUC2* T(-12150)C (rs10794288), *MUC2* C(-15161)T (rs10902088) (компания «Синтол», Россия). Протокол ПЦР состоял из следующих этапов: нагрев реакционной смеси при 95°C - 3 мин и амплификация в течение 40 циклов в следующем режиме: 95°C - 15 сек, 63°C - 40 сек.

Концентрацию VEGF-A в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» и автоматического анализатора «Lazurite» (Dynex Technologies Inc., США), согласно инструкциям тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Двухплащечный иммуноферментный анализатор «открытого типа» «Lazurite» обеспечивал полный цикл проведения ИФА в микропланшетном формате, включая спектрофотометрическую верификацию вносимых рабочих растворов и обработку результатов. Во все лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, затем добавляли по 100 мкл «0 дозы», стандартов, контролей и образцы сыворотки. Планшет инкубировали при 37°C в течение 2 ч (в режиме интенсивного помешивания) с последующим 5-кратным циклом отмывки. После внесения по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №1 (антитела к VEGF человека с биотином) во все лунки планшет инкубировали в течение 1 ч. Для удаления несвязанных компонентов проводили 5-кратный цикл отмывки. Далее добавляли в каждую лунку 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) и инкубировали в течение 30 мин. Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) был внесен в количестве 100 мкл после 5-кратной промывки с последующей инкубацией в течение 30 мин. при температуре 18-25°C (в темноте). Реакция была остановлена добавлением в лунки раствора 0,5 М серной кислоты (стоп-реагент). Референсные значения VEGF-A в сыворотке крови: 40-600 пг/мл.

Полученные данные подвергались обработке с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 26 для Windows. Данные из карт регистрации клинических данных пациента и результаты анализов вводились в специальные таблицы, а в дальнейшем подвергались автоматическому анализу. При описании данных и статистических результатов следовали рекомендациям SAMPL [Lang T.A. et al., 2014]. Нормальность распределения численных значений устанавливали на основании расчета W-критерия Шапиро-Уилка (при объеме выборки <50) и критерия Колмогорова-Смирнова (при объеме выборки > 50).

Значения анализируемых показателей каждой группы при соответствии закону нормального распределения представляли в виде средней арифметической (M) и стандартного отклонения (σ), в противном случае – в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25} ; Q_{75}). Статистическую значимость количественных величин с нормальным распределением оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Если величина t -критерия была равна 1,96 и больше, то можно утверждать, что разница показателей не случайна, зависит от определенной причины, вероятность ошибки выявить несуществующие различия не превышает 5% ($p < 0,05$).

Межгрупповые различия количественных величин с распределением, отличным от нормального, определяли с помощью U -критерия Манна-Уитни. Статистическую значимость различий качественных переменных оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. В небольших группах или в случае, когда отдельные частоты были в промежутке от 5 до 20 включительно, для оценки достоверности использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса. В случае сравнения групп с количеством наблюдений меньше 20 или в случае, когда отдельные частоты были меньше 5, для оценки достоверности использовали точный двусторонний критерий Фишера.

Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов с целью выявления ассоциации с эндометриозом и клинической картиной, а также соответствие выборок равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием метода χ^2 . Для определения риска заболевания у носителей определенных аллелей и генотипов вычислялось отношение шансов (OR – odds ratio) с 95% доверительным интервалом (95% C.I. – Confidence Interval).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) гена VEGF-A, C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288) гена MUC2 и C(-344)T (rs1799998) гена CYP11B2 с риском развития генитального эндометриоза и хронического эндометрита

Из исследованных полиморфизмов генов *VEGF-A*, *MUC2*, *CYP11B2*, полиморфизмы C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*, T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2*, C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* были ассоциированы с риском развития генитального эндометриоза.

Исследование полиморфных вариантов гена *VEGF-A* выявило взаимосвязь генотипа ТТ полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* с пониженным риском развития генитального эндометриоза (табл. 3). Также генотип ТТ и аллель Т полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* были ассоциированы с пониженным риском развития хронического эндометрита (табл. 4). Данный анализ позволяет предположить протективное влияние генотипа ТТ полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* на развитие эндометриоз-ассоциированного бесплодия.

Аллель С и генотип СС полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A* был ассоциирован с повышенным, а генотип ТТ и аллель Т полиморфизма C(+936)T

(rs3025039) гена *VEGF-A* – с пониженным риском развития генитального эндометриоза (табл. 3). Однако, взаимосвязи полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A* с хроническим эндометритом выявлено не было.

В исследуемых группах была установлена ассоциация генотипа CC полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с пониженным риском развития генитального эндометриоза (табл. 3). Как основная секретируемая форма муцинов, *MUC2* может воздействовать на окружающие ткани, влияя на фертильность, посредством нарушения секреции слизи и восприимчивости эндометрия. Также *MUC2* может способствовать инвазии или пролиферации клеток эндометрия [Walther-António M.R.S. et al., 2016; Liu Y. et al., 2018]. Однако взаимосвязи полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с хроническим эндометритом установлено не было. Также нами установлена ассоциация генотипа CC полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с пониженным риском развития эндометриоза (табл. 3), и напротив, ассоциация генотипа TT полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с повышенным риском развития генитального эндометриоза (табл. 3) и хронического эндометрита (табл. 4).

Таблица 3 - Распределение частот (%) аллелей и генотипов полиморфизмов генов *VEGF-A*, *MUC2*, *CYP11B2* в исследуемых группах

Полиморфизм	Распределение частот генотипов и аллелей		p, χ^2
	Группа сравнения (n=79)	Пациентки с генитальным эндометриозом (n=85)	
C(-460)T (rs833061) гена <i>VEGF-A</i>	TT – 31,6 TC – 46,8 CC – 21,5	TT – 16,5 TC – 50,6 CC – 32,9	p=0,023*, $\chi^2=5,2$ p=0,63, $\chi^2=0,23$ p=0,10, $\chi^2=2,68$
	T – 55,1 C – 44,9	T – 41,8 C – 58,2	p=0,08, $\chi^2=2,92$
C(+936)T (rs3025039) гена <i>VEGF-A</i>	CC – 40,6 CT – 38,0 TT – 21,4	CC – 68,2 CT – 30,6 TT – 1,2	p<0,001*, $\chi^2=12,71$ p=0,32, $\chi^2=0,99$ p<0,001*, $\chi^2=17,34$
	C – 59,4 T – 40,6	T – 83,5 C – 16,5	p<0,001*, $\chi^2=10,4$
C(-15161)T (rs10902088) гена <i>MUC2</i>	CC – 82,3 CT – 15,2 TT – 2,5	CC – 69,4 CT – 24,7 TT – 5,9	p=0,06, $\chi^2=3,68$ p=0,13, $\chi^2=2,31$ p=0,29, $\chi^2=1,13$
	C – 89,9 T – 10,1	C – 81,8 T – 18,2	p=0,036*, $\chi^2=4,39$
C(-344)T (rs1799998) гена <i>CYP11B2</i>	CC – 59,5 CT – 27,8 TT – 12,6	CC – 21,2 CT – 41,2 TT – 37,6	p=0,001, $\chi^2=25,13$ p=0,07, $\chi^2=3,21$ p=0,01, $\chi^2=13,42$
	C – 73,4 T – 26,6	C – 41,8 T – 58,2	p=0,49, $\chi^2=2,41$

Примечание: *- p < 0,05

Таблица 4 - Распределение частот (%) аллелей и генотипов полиморфизмов генов *VEGF-A*, *MUC2*, *CYP11B2* в исследуемых группах

Полиморфизм	Распределение частот генотипов и аллелей		p, χ^2
	Пролиферативный эндометрий (n= 11)	Хронический эндометрит (n= 74)	
C(-460)T (rs833061) гена <i>VEGF-A</i>	ТТ – 54,5 ТС – 36,4 СС – 9,1	ТТ – 10,8 ТС – 52,7 СС – 36,5	p=0,001*, $\chi^2=13,31$ p=0,31, $\chi^2=1,02$ p=0,07, $\chi^2=3,25$
	Т – 72,7 С – 27,3	Т – 37,2 С – 62,8	p=0,002, $\chi^2=9,96$
C(-344)T (rs1799998) гена <i>CYP11B2</i>	СС – 18,2 СТ – 63,6 ТТ – 18,2	СС – 21,6 СТ – 37,8 ТТ – 40,5	p=0,79, $\chi^2=0,07$ p=0,10, $\chi^2=2,63$ p=0,15, $\chi^2=2,04$
	С – 50 Т – 50	С – 40,5 Т – 59,5	p=0,40, $\chi^2=0,70$

Примечание: p < 0,05

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить полиморфные варианты и мутации генов-предикторов эндометриоза и хронического эндометрита. Поиск молекулярно-генетических аспектов развития генитального эндометриоза является важным шагом на пути к разработке новых методов диагностики развития генитального эндометриоза - как изолировано, так и в сочетании с хроническим эндометритом, а также персонифицированных подходов к патогенетической терапии этого заболевания.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*, C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* и C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с риском развития клинических симптомов, связанных с эндометриозом и эндометриоза яичников

Из исследованных полиморфизмов генов *VEGF-A*, *MUC2*, *CYP11B2*, полиморфизмы T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* и C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* были ассоциированы с риском развития клинических симптомов у пациенток с эндометриозом (табл. 5).

Исследование полиморфных вариантов гена *MUC2* выявило взаимосвязь генотипа ТТ и аллеля Т полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с повышенным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом, а также генотипа ТС полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с пониженным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом. Установлена ассоциация генотипа СС и аллеля С полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с повышенным риском развития дисхезии у женщин с эндометриозом (табл. 5).

Болевой синдром при эндометриозе обусловлен воспалительной реакцией на имплантацию и развитие эндометриоидной гетеротопии. В свою очередь гельобразующие муцины, вероятнее всего, защищают эктопичный эндометрий от

иммунной системы организма. Имплантируясь, эндометриоидная гетеротопия поражает нервные окончания, а также провоцирует образование новых мелких немиелинизированных волокон [Lang T.A. et al., 2014; Benner M. et al., 2018]. В процессе распространения очагов эндометриоза и вовлечения спаечным процессом близлежащих органов, пациентки, страдающие эндометриозом отмечают болевой синдром при коитусе и/или дефекации.

Таблица 5 - Распределение частот (%) аллелей и генотипов полиморфизма С Т(-12150)С (rs10794288) гена MUC2 в зависимости от наличия/отсутствия клинических симптомов в группе женщин с эндометриозом

Полиморфизм	Симптом	Распределение частот генотипов и аллелей (%)		p, χ^2
		Наличие	Отсутствие	
Т(-12150)С (rs10794288) гена MUC2	Диспареуния	(n=34)	(n=51)	
		ТТ - 91,2	ТТ - 68,6	$\chi^2=5,98, P=0,015^*$
		ТС - 8,8	ТС - 29,4	$\chi^2=5,18, P=0,02^*$
		СС - 0	СС - 2,0	$\chi^2=0,67, P=0,41$
		Т - 95,6	Т - 83,3	$\chi^2=5,90, P=0,015^*$
		С - 4,4	С - 16,7	
С(-344)Т (rs1799998) гена CYP11B2	Дисхезия	(n=14)	(n=71)	$\chi^2=4,72, P=0,03^*$
		СС - 42,9	СС - 16,9	$\chi^2=0,21, P=0,65$
		СТ - 35,7	СТ - 42,2	$\chi^2=1,88, P=0,17$
		ТТ - 21,4	ТТ - 40,8	
		С - 60,7	С - 38	$\chi^2=4,95, P=0,026^*$
		Т - 39,3	Т - 62	

Примечание: *-p <0,05

При выраженном спаечном процессе формируется выраженная диспареуния за счет фиксации матки в ретропозиции с образованием рубцовых деформаций крестцово-маточных связок [Wu J. et al., 2017]. Гормональный дисбаланс необходим для формирования и прогрессирования эндометриоза, распространение которого способствует формированию воспаления и может влиять на моторику кишечника, вызывая дисхезию [Левкович М.А. и др., 2017].

Из исследованных полиморфизмов генов VEGF -A, MUC2, CYP11B2, полиморфизм С(-460)Т (rs833061) гена VEGF-A был ассоциирован с повышенным риском образования эндометриоза яичников у женщин с эндометриозом. Наличие генотипа СС и аллеля С полиморфизма С(-460)Т (rs833061) гена VEGF-A было ассоциировано с повышенным риском образования эндометриоза яичников у женщин с эндометриозом (табл. 6).

Эндометриома – доброкачественное образование яичника, с тонкой капсулой и густым кровянистым содержимым. Капсула эндометриомы характеризуется отсутствием желез, содержимое в кисте накапливается путем менструальноподобной реакции эндометриоидной гетеротопии [Адамян Л.В. и др., 2018]. Имплантируясь в толщу яичника, эндометриоидная гетеротопия требует активного неоангиогенеза [Khan K.N. et al., 2010]. Таким образом, медиаторы

ангиогенеза, в частности, VEGF, необходимы для роста и пролиферации участков пораженного эндометрия [Khan K.N. et al., 2010].

Таблица 6 - Распределение частот (%) аллелей и генотипов полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* в зависимости от наличия эндометриоза яичников

Полиморфизм	Форма эндометриоза	Распределение частот генотипов и аллелей (%)		p, χ^2
		Наличие	Отсутствие	
C(-460)T (rs833061) гена <i>VEGF-A</i>	Эндометриоз яичников	(n=73) ТТ – 15,1 ТС – 46,6 СС – 38,4	(n=12) ТТ – 25,0 ТС – 75,0 СС – 0,0	$\chi^2=0,74$, P=0,39 $\chi^2=3,33$, P=0,07 $\chi^2=6,86$, P=0,009*
		Т – 38,4 С – 61,6	Т – 62,5 С – 37,5	$\chi^2=4,94$, P=0,026*

Примечание: *-p <0,05

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить полиморфные варианты и мутации генов-предикторов эндометриом и формирования дисхезии и диспареунии при эндометриозе. На наш взгляд, более глубокое понимание особенностей течения этого заболевания является важным шагом на пути к разработке новых методов диагностики и персонализированных подходов к его патогенетической терапии.

Выявление взаимосвязи полиморфных вариантов C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) гена VEGF-A с содержанием ангиогенного фактора VEGF-A в сыворотке крови

Ткань эндометрия требует кровоснабжения для роста и пролиферации, которое обеспечивается посредством неоангиогенеза [Khan K.N. et al., 2010]. Ангиогенез, являясь важнейшим процессом формирования новых кровеносных сосудов, имеет важное значение не только для физиологических процессов, включая эмбриональное развитие и заживление ран, но и в патологических состояниях, включая хроническое воспаление, рак, болезни сердца и диабетическую ретинопатию и др. [Soriano D. et al., 2012; Cavalcanti V. et al., 2016]. Он играет важную роль в стимуляции активности опухоли, включая ее рост, метастазирование и инвазию [Patel B.G. et al., 2018; Sikora J. et al., 2018].

Многочисленные факторы, включая гипоксию, цитокины и окислительный стресс приводят в повышенной проницаемости сосудистого эндотелия и выходу из сосудистого русла VEGF-A, который действуя на эндотелий, приводит к ослаблению концевых клеток (tip-cells), которые секретируют протеолитические ферменты, разрушая матрикс. Диффундируя в межклеточное пространство, концевые клетки активно пролиферируют, обеспечивая формирование капилляра [Dmowski W.P. et al., 1995; Cavalcanti V. et al., 2016; Czyzyk A. et al., 2017; Адамян Л.В. и др., 2019].

Высокие концентрации VEGF постоянно обнаруживаются в перитонеальной жидкости при эндометриозе, и, по-видимому, его уровень коррелирует со стадией заболевания [Ushio-Fukai M. et al., 2008].

Как уже упоминалось ранее, нами была выявлена взаимосвязь генотипа ТТ полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* с пониженным риском развития генитального эндометриоза, а генотипа ТТ и аллеля Т полиморфизма гена неоангиогенеза *VEGF-A* C(-460)T (rs833061) с пониженным риском развития хронического эндометрита. Полиморфизм C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* находился в неравновесном сцеплении в группах пациенток с эндометриозом и женщин без эндометриоза, что не оказывало влияния на содержание фактора VEGF-A в сыворотке крови. Однако следует отметить, что среди пациенток с генитальным эндометриозом, уровень исследуемого цитокина по всем генотипам локуса C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* оказался значимо ниже такового, чем у женщин, вошедших в группу сравнения.

Аллель С и генотип СС полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A* был ассоциирован с повышенным, а генотип ТТ и аллель Т полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A* с пониженным риском развития генитального эндометриоза. При анализе распределения частот генотипов полиморфного сайта C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A* было выявлено, что в группе сравнения, при наличии гетерозиготного генотипа СТ, уровень цитокина VEGF – А был в 1,5 раза выше в сравнении с гомозиготными генотипами (рис. 1). Проведённый иммуноферментный анализ позволил выявить значимое снижение (в 2,5 раза) уровня ангиогенного цитокина VEGF-A в крови у всех пациенток, страдающих эндометриозом (независимо от степени тяжести заболевания), относительно значений группы женщин без эндометриоза. Однако при проведении сравнительного анализа содержания VEGF-A в зависимости от степени тяжести эндометриоза, только у пациенток с IV стадией эндометриоза было отмечено достоверное снижение исследуемого фактора в 4,5 раза по сравнению с аналогичными показателями группы сравнения ($p < 0,001$) (табл. 7).

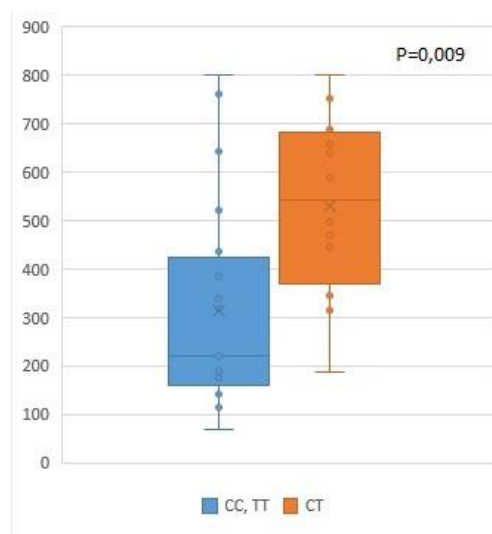


Рисунок 1 - Содержание (пг/мл) VEGF-A в крови женщин группы сравнения с генотипами полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*

Таблица 7 - Концентрация цитокинов VEGF-A в сыворотке крови (пг/мл) исследуемых групп (Me (Q1-Q3))

Показатель	Группа сравнения (n=79)	Пациентки с генитальным эндометриозом		
		I-II ст. (n=9)	III ст. (n=16)	IV ст. (n=60)
	1	2	3	4
VEGF-A, пг/мл	341,9 (187,4-625,0)	371,0 (234,4-486,2)	213,3 (168,2-405,3)	74,4 (56,7-89,8)
P-значение, различия с группами		P1-2=0,98	P1-3=0,28 P2-3=0,52	P1-4<0,001* P2-4<0,001* P3-4<0,001*

Примечание: *согласно критерию Манна-Уитни

Роль факторов ангиогенеза в патогенезе пролиферативных заболеваний репродуктивной системы является неоспоримой [Dmowski W.P. et al., 1995]. Как было описано выше, наиболее значимым из известных факторов ангиогенеза является VEGF-A, способный не только инициировать митогенную активность и подавлять апоптоз эндотелиальных клеток, но и повышать перфузию сосудов (что изначально было определено как основной механизм его действия) [Patel B.G. et al., 2018; Sikora J. et al., 2018]. Местная гиперэстрогения сопровождается повышением уровня VEGF-A в эндометриальных клетках и усилением процессов неоангиогенеза вокруг эндометриоидной гетеротопии. А также у пациенток с эндометриозом отмечается более высокий уровень VEGF-A в перитонеальной жидкости [Soriano D. et al., 2012], который взаимосвязан со степенью тяжести эндометриоза. VEGF-A посредством неоангиогенеза способствует имплантации эктопического эндометрия [Johnston-MacAnanny E.B. et al., 2010, Soriano D. et al., 2012].

VEGF-A кодируется геном на хромосоме 6p12, который включает кодирующую область размером 14 тысяч пар нуклеотидов из восьми экзонов и демонстрирует альтернативный сплайсинг с образованием семейства белков. Путем активации и образования связей с мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1 VEGF и рецептором-2 VEGF) *VEGF-A* влияет на формирование и пролиферацию новых кровеносных сосудов. В 3'-нетранслируемом регионе гена полиморфная позиция в положении C(+ 936)T влияет на уровень VEGF-A в сыворотке крови [Khan K.N. et al., 2018]. По данным литературы, полиморфизм промоторного региона гена неоангиогенеза *VEGF-A* в позиции +405G/C (rs2010963) ассоциирован с повышением выработки VEGF-A стимулированными мононуклеарными фагоцитами крови [D'Hooghe T.M. et al., 1995]. В ходе изучения зарубежной литературы однозначных сведений об ассоциации полиморфизма G(-405)C гена *VEGF* с риском развития генитального эндометриоза обнаружено не было, напротив, сообщались как опровергающие [Kitaya K., 2011], так и подтверждающие взаимосвязь исследования [Soriano D. et al., 2012]. Поскольку генетические полиморфизмы часто различаются среди этнических групп, столь вариабельные результаты влияния SNP на развитие

эндометриоза в разных популяциях могут быть ассоциированы с различным генетическим фоном. Проведенное исследование уточнило, что аллель С и генотип СС полиморфизма С(+936)Т (rs3025039) гена *VEGF-A* повышают риск формирования эндометриоза у женщин славянской популяции Северо-Западного федерального округа. При наличии генотипа ТТ полиморфизма С(-460)Т (rs833061), генотипа ТТ и аллеля Т полиморфизма С(+936)Т (rs3025039) гена *VEGF-A*, вероятность формирования эндометриоза, наоборот, снижается. Как уже упоминалось ранее, неоангиогенез создает благоприятные условия для выживания и пролиферации эктопического эндометрия, которая невозможна без усиленной продукции факторов ангиогенеза посредством гиперэстрогении [Park J.H. et al., 2016; Baker J.M. et al., 2018]. Выявленные полиморфные варианты гена неоангиогенеза *VEGF-A* (полиморфизм С(+936)Т (rs3025039), полиморфизм С(-460)Т (rs833061)), ассоциированные с генитальным эндометриозом, вероятно, способствуют усилению образования фактора роста эндотелия сосудов, а также инициации ангиогенеза при эндометриозе. Способствуя имплантации эндометриоидной гетеротопии активный неоангиогенез предрасполагает развитию дисменореи [Sikora J. et al., 2018]. С другой стороны, статистически достоверное повышение частот генотипов полиморфизма гена фермента метаболизма андрогенов С(-344)Т (rs1799998) *CYP11B2* у женщин с эндометриозом, вероятно, опосредует дисбаланс ароматации тестостерона, что способствует развитию гиперэстрогении, которая необходима для развития и прогрессирования генитального эндометриоза. В свою очередь, ассоциация полиморфизма Т(-12150)С (rs10794288) гена *MUC2* с генитальным эндометриозом, объясняет защитные механизмы эктопичного эндометрия в отношении окружающей микросреды брюшной полости. Вышеописанные данные позволяют определить влияние молекулярно-генетических особенностей, обуславливающих иммунологические и гормональные нарушения, на развитие эндометриоза (рисунок 2).

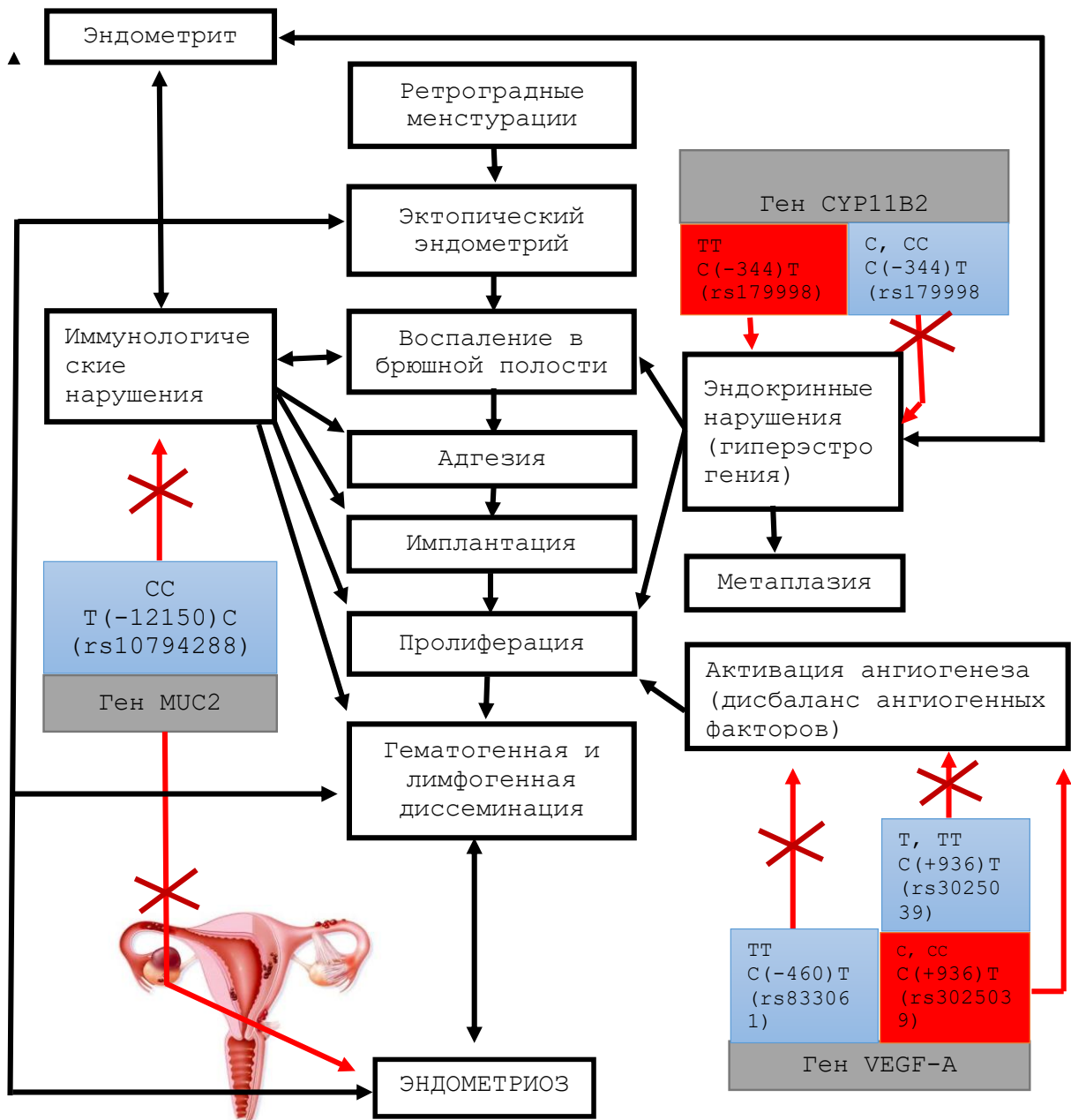


Рисунок 2 - Схема, отражающая вклад полиморфных вариантов генов неоангиогенеза VEGF-A, гельобразующего муцина MUC2 и фермента метаболизма андрогенов CYP11B2 в развитие генитального эндометриоза и особенности его течения

Обозначения:

↑ - по данным собственного исследования
 ↓ - пониженный риск развития эндометриоза

↑ - по данным литературы
 ↓ - повышенный риск развития эндометриоза

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены аллельные варианты полиморфизмов генов неангиогенеза (C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*), гельобразующих муцинов (T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2*), а также генов метаболизма андрогенов (C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2*), способствующих развитию гиперэстрогении, оценен уровень фактора ангиогенеза (VEGF –A) в крови, а также его взаимосвязь со степенью тяжести генитального эндометриоза.

В ходе работы установлен вклад полиморфных вариантов генов *VEGF-A*, *MUC2*, *CYP11B2* в риск развития генитального эндометриоза. Полиморфизмы генов неангиогенеза *VEGF-A* C(-460)T (rs833061), C(+936)T (rs3025039), гельобразующих муцинов *MUC2* T(-12150)C (rs10794288), ферментов метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) были ассоциированы с риском развития генитального эндометриоза.

Установлена ассоциация генотипа CC и аллеля C полиморфизма гена неангиогенеза *VEGF-A* C(+936)T (rs3025039) и генотипа TT полиморфизма гена ферментов метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) с повышенным риском развития генитального эндометриоза (рисунок 2). Установлена ассоциация генотипа TT полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A*, генотипа TT и аллеля T полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*, генотипа CC полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2*, генотипа CC полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с пониженным риском развития генитального эндометриоза.

Выявлена прямая связь генотипа TT и аллеля T полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с повышенным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом, а также генотипа TC полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с пониженным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом. Установлена ассоциация генотипа CC и аллеля C полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* с повышенным риском развития дисхезии у женщин с эндометриозом. В ходе исследования выявлена ассоциация генотипа CC и аллеля C полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* с повышенным риском образования эндометриом у женщин с эндометриозом.

При анализе распределения частот генотипов полиморфного сайта C(+936)T гена *VEGF-A* было выявлено, что в группе сравнения, при наличии гетерозиготного генотипа CT, уровень цитокина VEGF-A был в 1,5 раза выше относительно гомозиготных генотипов. Проведённый иммуноферментный анализ у обследованных женщин показал снижение (в 2,5 раза) уровня ангиогенного цитокина VEGF-A в сыворотке крови у пациенток, страдающих эндометриозом в сравнении с группой пациенток без эндометриоза. Очевиден вклад изученных полиморфизмов генов в патогенез эндометриоза, однако, по отдельности, аллельные варианты генов неангиогенеза (C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A*, генотипа TT и аллеля T полиморфизма C(+936)T (rs3025039) гена *VEGF-A*), ферментов метаболизма андрогенов (C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2*), гельобразующих муцинов (T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2*), фактора ангиогенеза (VEGF-A) для оценки предрасположенности к эндометриозу, а также прогнозированию течения заболевания и его ответа на комбинированную терапию, недостаточны (рисунок 2).

С целью большего понимания патогенетических особенностей течения эндометриоза и индивидуализации прогноза течения и эффективности терапии заболевания, необходим дополнительный анализ ассоциаций полиморфизмов вышеперечисленных генов и уровня фактора ангиогенеза. Резюмируя итоговые данные проведенного исследования, необходимо отметить, что они позволяют определить генетическое детерминирование синтеза факторов неоангиогенеза и стероидогенеза, а также модификацию гельобразующих муцинов, что вносит значимый вклад не только в патогенез эндометриоза, но и способствует развитию резистентности к заболеванию.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости полиморфных вариантов генов ангиогенеза *VEGF-A* C(+936)T (rs3025039) (аллеля С и генотипов СС) и фермента метаболизма андрогенов *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) (генотипов ТТ) у женщин с генитальным эндометриозом выше, чем у женщин без эндометриоза.
2. Полиморфные варианты генов *VEGF-A* C(-460)T (rs833061) (генотип ТТ), C(+936)T (rs3025039) (аллель Т и генотип ТТ), *MUC2* T(-12150)C (rs10794288) (генотип СС) и *CYP11B2* C(-344)T (rs1799998) (генотип СС) являются протективными в отношении развития генитального эндометриоза.
3. Установлена прямая связь генотипа ТТ и аллеля Т полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с повышенным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом, а также генотипа ТС полиморфизма T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с пониженным риском развития диспареунии у женщин с эндометриозом. Генотип СС и аллель С полиморфизма C(-344)T (rs1799998) гена *CYP11B2* предрасполагают к развитию дисхезии у женщин с эндометриозом.
4. Генотип СС и аллель С полиморфизма C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* взаимосвязаны с образованием эндометриом у женщин с эндометриозом.
5. Выявлена положительная взаимосвязь генитального эндометриоза с хроническим эндометритом у пациенток Северо-Западного федерального округа России.
6. У пациенток с генитальным эндометриозом по всем генотипам локуса C(-460)T (rs833061) гена *VEGF-A* уровень фактора VEGF-A в крови, чем у женщин без эндометриоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куликова Н.В., Коваленко И.И., Байбуз Д.В., Лебедева Я.А. Роль генетических полиморфизмов генов VEGF, COX 2, MUC в развитии эндометриозассоциированного бесплодия // Гинекология. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 34-37 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,727).
2. Скуратовская Д.А., Юрова К.А., Куликова Н.В., Афанасьева М.В., Седнев О.В., Цивьян Б.Л., Литвинова Л.С. Исследование взаимосвязи полиморфных вариантов генов VEGF и MUC2 с риском развития эндометриоз // Медицинская генетика. - 2018. - Т. 17, № 8. - С. 48-52 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,351).

3. Куликова Н.В., Коваленко И.И., Литвинова Л.С., Шперлинг Н.В., Иванов А.В., Скуратовская Д.А., Байбуз Д.В., Лебедева Я.А., Пестун Е.М. Исследование ассоциации одиночных нуклеотидных полиморфизмов генов MUC2 и CYP11B2 с развитием наружного генитального эндометриоза у пациенток славянской популяции Северо-Западного федерального округа России // Гинекология. – 2020. - Т. 22, № 2. - С. 22-25 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,727).
4. Скуратовская Д.А., Юрова К.А., Куликова Н.В., Седнев О.В., Литвинова Л.С. Способ ранней генетической диагностики риска развития генитального эндометриоза. Патент на изобретение RU 2676693 C1, 10.01.2019. Заявка №2017137477 от 25.10.2017.
5. Куликова Н.В., Литвинова Л.С., Шперлинг Н.В. Ассоциация патологии эндометрия с генитальным эндометриозом среди пациенток, длительное время проживающих на территории Северо-западного федерального округа России // Наука и образование: отечественный и зарубежный опыт. Сборник трудов конференции: сороковая международная научно-практическая конференция (Белгород). - 2021. – С. 106-110.
6. Куликова Н.В., Литвинова Л.С., Шперлинг Н.В. Исследование уровня белка VEGF-A у пациенток с генитальным эндометриозом различной степени, длительное время проживающих на территории Северо-Западного Федерального округа РФ // Наука и образование: отечественный и зарубежный опыт. Сборник статей IV Международной научно-практической конференции: Наука и образование в современном обществе: актуальные вопросы и инновационные исследования (Пенза) - 2021. - С 192-197.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИФА	Иммуноферментный анализ
РНК	Рибонуклеиновая кислота
COX	(от англ. Cyclooxygenase) – циклооксигеназа
CYP	(от англ. Cytochrome) – цитохром
IL	(от англ. Interleukin) – интерлейкин
INF- γ	(от англ. Interferon gamma) - интерферон гамма
MUC	(от англ. Mucin) - муцин
R-AFS/ASRM	(от англ. American Fertility Society) - Американского общества фертильности
VEGF	(от англ. Vascular endothelial growth factor) - фактор роста эндотелия сосудов

Куликова Наталья Владимировна

**РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ НЕОАНГИОГЕНЕЗА,
ГЕЛЬОБРАЗУЮЩЕГО МУЦИНА И ФЕРМЕНТА МЕТАБОЛИЗМА
АНДРОГЕНОВ В РАЗВИТИИ ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

3.3.3. Патологическая физиология

Подписано в печать __. __.2021
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 1,5. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано Полиграфическим центром
Балтийского федерального университета им. И. Канта
236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6