

На правах рукописи

БЕХБУДОВА ЛАМАРА ХАНБАЛАЛОВНА

**ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ
РЕЦЕПТОРОВ СТЕРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ
КЛЕТКАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С МИОМОЙ МАТКИ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор

Карева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Кузьминых Татьяна Ульяновна - доктор медицинских наук, руководитель родильного отделения федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Яворский Александр Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.208.072.01 на базе государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 11799, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997 г. Москва, ул. Островитянова д.1 и на сайте rsmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

А.С. Духанин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

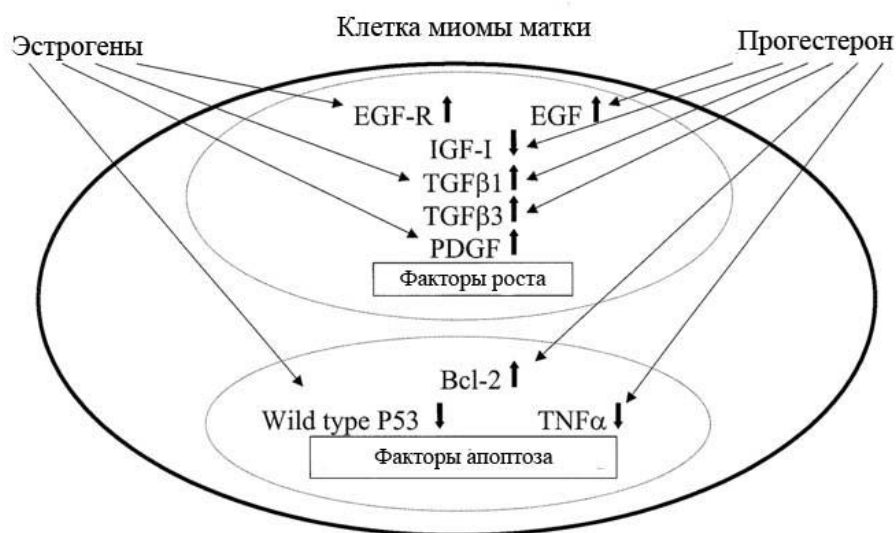
Миома матки одно из самых распространенных заболеваний женской репродуктивной системы. Частота возникновения миомы составляет 15–17% у женщин старше 30 лет и 30–35% у женщин пременопаузального возраста [Самойлова Т.Е., 2012], в последние годы наблюдается «омоложение» миомы. Средний возраст выявления заболевания составляет $32,8 \pm 0,47$ года, а показания к хирургическому лечению (как правило, радикальному) появляются примерно к 45 годам [Савельева Г.М., 2012; Каппушева Л.М., 2011].

Вопрос об этиологии миомы матки, несмотря на длительную историю изучения, до сих пор остается открытым [Савицкий Г.А., 2003]. Высокая встречаемость миомы у пациенток старшего возраста наводит на мысль о том, что она является результатом накопления мутации(й) в утеромиоцитах. В результате генетических исследований было показано, что почти в 50% случаев клетки миомы матки имеют хромосомные aberrации [Sabry M., 2012; Di Tommaso S., 2015]. Доказано, что рост опухоли является следствием нарушения баланса клеточной пролиферации и апоптоза [Буянова С.Н., 2008; Айламазян Э.К., 2007]. Появление миомы у женщины, преимущественно после менархе, и уменьшение ее размеров в постменопаузальном периоде свидетельствует о прямом участии половых гормонов в патогенезе заболевания.

Половые стероиды являются физиологическими регуляторами пролиферации и апоптоза клеток-мишеней [Kim J.J., 2012; Сергеев П.В., 1994]. В настоящее время существует устойчивое мнение о комплексном эстроген-гестагенном контроле пролиферации клеток репродуктивного тракта женщины, в котором основная пролиферативная роль отводится гестагенному компоненту, тогда как эстрадиол осуществляет «разрешающую» функцию по отношению к своему партнеру [Карева Е.Н., 2013].

В реализации активности половых стероидов участвуют ауто- и паракринные факторы. Например, митогенное действие эстрогенов опосредованно увеличением транскрипции генов местных факторов роста ($TGF\beta$, bFGF, EGF, PDGF, VEGF, IGF) (рис. 1). Факторы роста, при условии достаточной экспрессии их рецепторов, вызывают стимуляцию клеточной пролиферации, гипертрофию и увеличение объема межклеточного матрикса [Flake G.P., 2003; Knapp P., 2012] (рис. 1).

Рисунок 1. Влияние половых стероидов на экспрессию факторов роста и апоптоза в клетках миомы матки (адаптировано из Maguо T., 2004).



Базовыми в медикаментозном лечении миомы матки являются препараты, уменьшающие действие эндогенных половых гормонов на миометрий. Снизить эффект влияния эндогенных гормонов на ткань-мишень можно несколькими способами. Центральная блокада секреции гонадотропинов (аГнРГ) сопровождается тяжелым посткастрационным синдромом. Антиэстрогенный эффект можно достичь с помощью блокаторов эстрогеновых рецепторов (прямое действие) и ингибиторов ароматазы (косвенный эффект). В научной литературе

недостаточно данных по клиническому применению этих групп препаратов в лечении миомы матки. Косвенный антиэстрогенный эффект можно получить с помощью прогестинов, которые тормозят экспрессию эстрогеновых рецепторов и стимулируют ферменты метаболизма эстрадиола.

После выявления роли прогестерона в патогенезе миомы были предложены и в настоящее время с успехом используются препараты с антигестагенной активностью: мифепристон, азоприснил, улипристал [Савельева Г.М., 2012].

Современные научные данные о фармакодинамических свойствах этих препаратов позволили их отнести к селективным модуляторам рецепторов прогестерона (СМРП) [Wilkins J., 2008; Rabe T., 2013]. Из всего спектра медикаментозных средств, применяемых для лечения миомы матки, СМРП отличаются лучшим профилем безопасности и высокой эффективностью [Карева Е.Н., 2010].

В мире в подавляющем большинстве случаев в качестве СМРП уже более 30 лет применяют мифепристон. Единственным дженериком мифепристона в РФ, разрешенным для лечения миомы матки, является гинестрил («STADA») [Яворский А.Н., 2014].

Как и любые лекарственные препараты, селективные модуляторы рецепторов прогестерона имеют побочные эффекты. Наряду с классическими нежелательными явлениями – тошнота, головная боль и др., для СМРП характерно развитие в эндометрии пациенток обратимых специфических изменений его железистого, стромального и сосудистого компонентов. Активация пролиферативных процессов в эндометрии на фоне лечения СМРП, как показал многолетний клинический опыт, принципиально отличается от патологической гиперплазии эндометрия, которая является фоновым состоянием канцерогенеза. Всемирный Консенсус патоморфологов, посвященный данному вопросу, в 2006 году утвердил термин– Progesterone Receptor Modulators Associated Endometrial Changes (РАЕС, изменения эндометрия, ассоциированные с терапией

модуляторами рецепторов прогестерона). Вследствие своей уникальности и класс-специфичности, РАЕС авторизованы в 2012 году Европейским Медицинским Агентством как самостоятельный вид обратимых морфологических изменений эндометрия [Mutter G.L., 2008; Fiscella J., 2011]. Неудобный для использования громоздкий термин РАЕС не нашел широкого применения в нашей стране. Гинекологи предложили для обозначения этого сопутствующего явления антигестагенной терапии название «железистая дилатация эндометрия». Данный термин еще раз подчеркивает безопасность и обратимость указанного явления [Тапильская Н.И., 2015]. Средняя частота встречаемости РАЕС составляет от 15 до 30% [Horne F.M., 2007].

Эффективность лечения миомы СМРП в среднем составляет 85-95%, но даже при такой высокой клинической эффективности препаратов остается 15% пациенток нечувствительных к проводимой терапии. Причинами отсутствия эффекта лечения являются или уменьшение концентрации ЛС в крови (за счет активации метаболизма), или нарушение чувствительности ткани (за счет снижения плотности рецепторов или их мутации). То есть, существует материальная причина отсутствия эффекта СМРП, которую можно использовать для персонального подбора адекватной терапии. Биологический материал должен обеспечивать получение необходимой и достаточной информации, при этом быть доступным для исследования (исключены биопсии тканей миомы или печени). Клетки Мононуклеарной фракции периферической крови (МНФК) полностью отвечают данным требованиям и поэтому широко используются для научных и практических целей [Карева Е.Н., 2015].

персонализированный подход в назначении СМРП у пациенток с миомой является резервом повышения эффективности лечения. Для разработки такого подхода необходим анализ данных динамического исследования ключевых молекулярно-фармакологических и биохимических параметров мишеней половых

гормонов у пациенток с миомой матки в зависимости от успеха лечения мифепристоном и частоты проявления нежелательных явлений.

Значение иммунной системы в процессах саногенеза с одной стороны, влияние прогестерона и СМРП на функциональную активность мононуклеаров крови, как ранее было показано на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева [Карева Е.Н., 2008], с другой, свидетельствуют о том, что эндокринный и иммунный контроль пролиферации гормон-зависимых тканей женщины взаимосвязан.

В качестве объекта исследования нами выбраны мононуклеарные клетки периферической крови, которые в последнее время с успехом используются для мониторинга лечения гормонозависимых заболеваний репродуктивной системы женщины [патент РФ №2312354]. МНФК экспрессируют практически все рецепторы половых стероидных гормонов, что подтверждает эндокринный контроль функции иммунокомпетентных клеток [Klein S.L., 2010]. Ранее нами показано, что в МНФК количественно преобладает экспрессия следующих стероидных рецепторов: мембранный рецептор эстрадиола (mER), ядерный рецептор прогестерона типа А (PR-A), ядерные глюкокортикоидные (GR) и андрогеновые (AR) рецепторы [Карева Е.Н., 2012].

Учитывая роль половых гормонов в патогенезе миомы матки, а также наличие и функциональное значение рецепторов стероидов в иммунокомпетентных клетках, нами в качестве молекулярно-фармакологических кандидатов – маркеров прогноза эффективности и наличия сопутствующих явлений антигормональной терапии выбран стероидно–рецепторный транскриптом клеток МНФ периферической крови пациенток с миомой матки.

Цель исследования: изучить экспрессию генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с миомой матки до и после лечения мифепристоном в зависимости от показателей эффективности терапии и наличия нежелательных явлений.

Задачи исследования:

- 1) Оценить клиническую эффективность применения мифепристона (гинестрил 50 мг/сутки внутрь ежедневно, 3 месяца) в терапии миомы матки у пациенток репродуктивного возраста.
- 2) Определить экспрессию генов рецепторов эстрогенов, гестагенов, глюкокортикоидов и андрогенов в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с миомой матки на 19-21 день м.ц.
- 3) Исследовать влияние мифепристона (гинестрил 50 мг/сутки внутрь, 3 месяца) на экспрессию генов рецепторов эстрогенов, гестагенов, глюкокортикоидов и андрогенов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с миомой матки.
- 4) Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в клетках мононуклеарной фракции крови пациенток и клинической эффективности мифепристона в лечении миомы матки.
- 5) Оценить частоту встречаемости мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки и возможную зависимость ее от эффективности лечения.
- 6) Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток и частоты встречаемости мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у женщин с миомой матки.

Научная новизна исследования

Впервые изучено влияние мифепристона на экспрессию генов рецепторов mER, PR-A, GR и AR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки. Впервые показано ингибирующее влияние мифепристона на экспрессию гена рецептора прогестерона типа A в клетках МНФ пациенток с миомой. Предложено использовать стероидный транскриптом как косвенный

маркер эффективности мифепристона в терапии пациенток с миомой матки (уровень мРНК GR более 0,011 о.е.).

Впервые обнаружены особенности рецепторного профиля в МНФК у женщин с измененным эндометрием на фоне лечения препаратом и предложен потенциальный маркер развития мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки (уровень мРНК AR менее 0,028 о.е.).

Практическая значимость

Результаты исследования, полученные в ходе диссертационной работы, позволяют считать, что рецепторный профиль иммунокомпетентных клеток может служить косвенным прогностическим признаком эффективности и целесообразности применения мифепристона в терапии пациенток с миомой матки. Увеличение уровня экспрессии гена GR более 0,011 о.е. в моноклеарных клетках крови пациенток может свидетельствовать о снижении эффективности мифепристона в терапии миомы матки (чувствительность маркера 78%, специфичность - 70%). Анализ данных параметров позволит прогнозировать исход терапии для подбора оптимального способа лечения пациентки.

Результаты диссертационной работы позволяют считать, что снижение уровня относительной экспрессии гена AR менее 0,028 о.е. в клетках моноклеарной фракции крови свидетельствует о высокой вероятности развития железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки на фоне терапии мифепристоном (чувствительность маркера 90%, специфичность – 50%).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Выявлен новый молекулярный механизм антипролиферативного действия мифепристона в отношении миомы матки в иммунокомпетентных клетках – снижение экспрессии гена ядерного рецептора прогестерона типа А.

Экспрессия гена GR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки (до начала лечения) имеет отрицательную корреляционную связь с успехом последующей терапии мифепристоном (Spearman $r = -0,41$, $p = 0,02$).

Уровень экспрессии гена AR может служить маркером прогноза риска развития железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки на фоне терапии мифепристоном.

Внедрение полученных результатов исследования в практику

Результаты внедрены в практическую деятельность отделения гинекологической эндокринологии Перинатального медицинского Центра.

Материалы используются в учебно-педагогическом процессе кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Апробация работы

Апробация работы состоялась на заседании коллектива сотрудников кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева и сотрудников научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова № 21 от 17 июня 2015 г.

Личное участие автора

Автор лично анализировал существующие источники литературы по теме исследования, принимал участие в планировании схемы экспериментов, проводил экспериментальные исследования и анализировал полученные результаты.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, отражающих ее основное содержание, из которых – 6 в рецензируемых научных журналах.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, глав, посвященных обзору литературы, описанию методов исследования, изложению результатов работы и их обсуждению, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 119 источников. Работа изложена на 102 страницах, иллюстрирована 14 рисунками, содержит 3 таблицы, 15 диаграмм и 2 схемы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы образцы периферической крови 50 пациенток репродуктивного возраста, проходивших обследование и медикаментозное лечение в отделении гинекологической эндокринологии МОНИИАГ (директор – чл.–корр. РАН, профессор Краснопольский В.И.) у врача Горенковой О.С. и на базе Национального медико-хирургического Центра имени Н.И. Пирогова (президент -академик РАМН, профессор Шевченко Ю.Л.) у врача Самойловой Т.Е. Мифепристон (Гинестрил «STADA») пациентки принимали внутрь начиная с 1-2-го дня менструального цикла ежедневно, непрерывно в дозе 50 мг. Курс приема препарата 3 месяца.

Перед включением в исследование у каждой пациентки получено информированное согласие на участие в исследовании.

Возраст пациенток составил в среднем $44 \pm 1,1$ года.

МНФК выделяли из периферической крови в градиенте плотности фикола ($\rho=1,077$ г/см³, («ПанЭко», Россия) [Воупт А., 1968]. Подсчет мононуклеарных клеток производили в камере Горяева под микроскопом Биолам П2-1 («ЛОМО», Россия) с помощью красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия).

Получение мРНК из клеток МНФ проводили с помощью набора "Рибо-преп" («AmpliSens», Россия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью

набора "Реверта-L" («AmpliSens», Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с «Реакционной смесью 2,5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и соответствующими праймерами («Синтол», Россия) на приборе iCycler iQ5 real-time PCR («BioRad», Германия). В качестве контрольного гена использовался ген GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Для оценки числа копий мРНК применяли Δ Ct-метод: $1/2^{-\Delta C_t}$ и $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где C_t – пороговый цикл, ΔC_t – разница между пороговым циклом исследуемого гена и геном сравнения (GAPDH), $\Delta\Delta C_t$ – сравнение значений ΔC_t контрольного и опытного образцов [Schmittgen T.D., 2008]. Относительный уровень мРНК представлен в виде относительных единиц (о.е., $1/2^{-\Delta C_t}$)

Все данные исследования обрабатывали с использованием пакета приложений Microsoft Office и программы GraphPad Prism. Для проверки гипотезы о принадлежности наблюдаемой выборки нормальному закону распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова, для сравнения средних значений применяли W – критерия Вилкоксона, U – критерия Манна-Уитни. При проведении корреляционного анализа связи между параметрами внутри одной выборки использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимали $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка клинической эффективности применения мифепристона для терапии миомы матки у пациенток репродуктивного возраста.

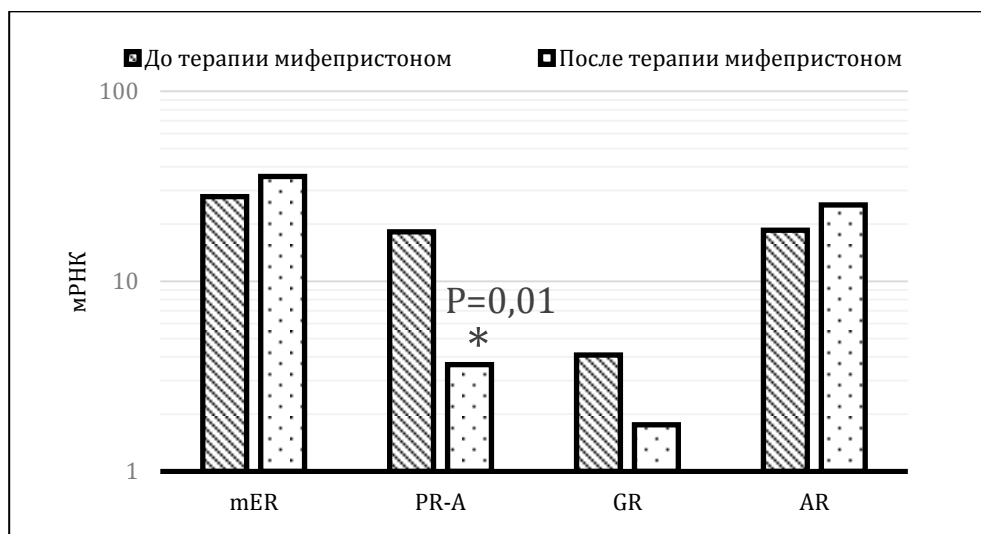
В качестве основного параметра эффективности терапии использовали уменьшение объема опухоли от первоначальных значений в процентах. Показано, что мифепристон в дозе 50 мг ежедневно, внутрь в течение 3 месяцев вызывает уменьшение размеров миоматозных узлов у 86% (43/50) пациенток. По данным

УЗИ уменьшение размеров миоматозных узлов в среднем составило 44%. Не обнаружено положительного эффекта от лечения у 14% (7/50) пациенток, из них у одной (2%) объем миоматозных узлов не изменился, у 12% (6/45) объем миоматозных узлов увеличился. Полученные нами результаты совпадает с данными отечественных и международных клинических исследований [Самойлова Т.Е., 2012; Bagaria M., 2009; Engman M., 2009; Esteve J.L., 2013; Kulshrestha V., 2013].

2. Влияние мифепристона на экспрессию генов рецепторов эстрогенов, гестагенов, глюкокортикоидов и андрогенов в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с миомой матки.

Результаты исследования влияния мифепристона на экспрессию генов рецепторов эстрогенов (mER), прогестерона (PR-A), андрогенов (AR) и глюкокортикоидов (GR) в клетках МНФ крови пациенток с миомой матки до лечения и после терапии препаратом представлены на диаграмме (диаг.1).

Диаграмма 1. Уровень экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарах периферической крови пациенток до и после терапии мифепристоном (Me, мРНК, о.е., $10^3 * 0,5^{\Delta Ct}$).



*Примечание: mER – мембранный рецептор эстрадиола, PR-A – ядерный рецептор прогестерона типа А, GR – ядерные рецепторы глюкокортикоидов, AR – ядерные рецепторы андрогенов. Ген сравнения - GAPDH, * - достоверные различия с аналогичным параметром до лечения (Вилкоксон)*

Показатели уровня мРНК рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарах пациенток находились в широком диапазоне физиологических значений, нами выявлено статистически достоверное снижение экспрессии гена ядерного рецептора PR-A в 9,8 раз ($p=0,01$). Таким образом, терапия мифепристоном пациенток с миомой матки сопровождается изменением стероидного транскрипта иммунокомпетентных клеток периферической крови.

3. Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарах периферической крови пациенток и клинической эффективности применения мифепристона в лечении миомы матки.

Для того, чтобы оценить влияние мифепристона на экспрессию генов рецепторов стероидных гормонов в МНФК, пациенток, включенных в клиническое исследование, в зависимости от успеха терапии мифепристоном разделили на две группы: I - положительный эффект от терапии, II - отсутствие эффекта (табл.1).

Для исключения возможного влияния внешних факторов на результаты исследования был проведен анализ признаков генеральной совокупности при помощи метода Хи-квадрат. Статистическая обработка данных показала отсутствие достоверных отличий в группах.

Таблица 1.

Клинические и антропометрические характеристики пациенток в зависимости от эффекта терапии мифепристоном миомы матки (Mean± SE).

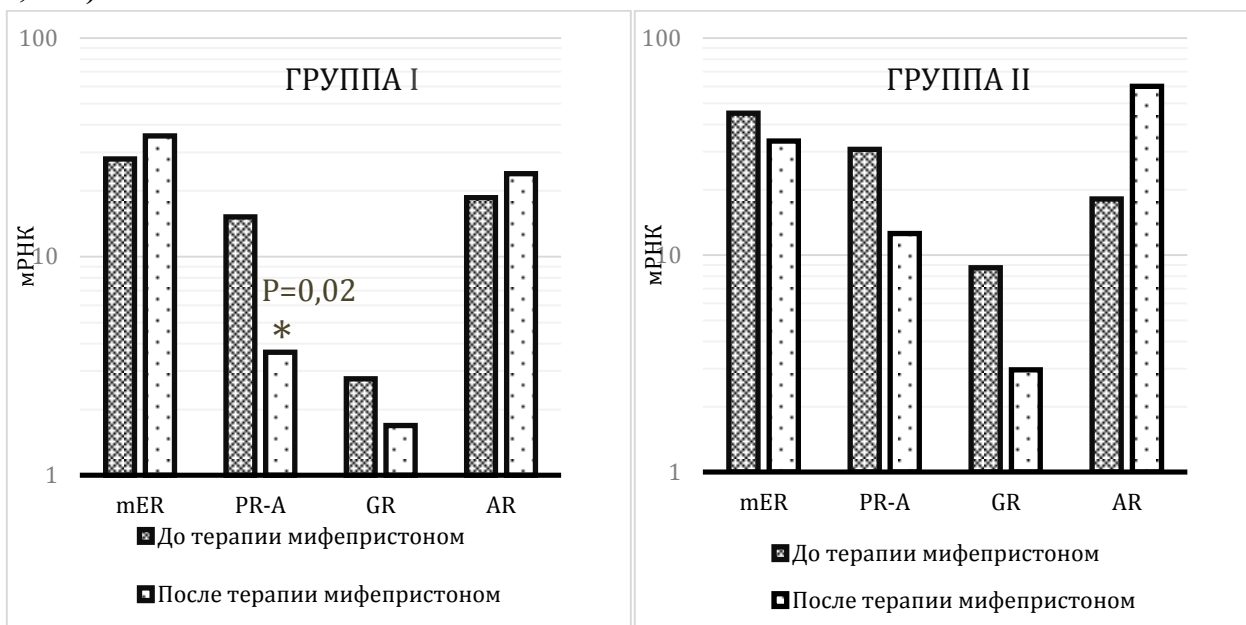
Параметры	I Положительный эффект от терапии	II Отсутствие эффекта от терапии	p
Количество пациенток	43	7	0,0001*
Возраст пациенток	42 ± 0,7	45 ± 1,5	0,5
ИМТ пациенток	25 ± 0,7	25 ± 1,5	0,4
Патология сердечно- сосудистой системы	0	0	NA
Патология щитовидной железы	1	0	1,0
Патология мочевыделительной системы	0	0	NA
Индивидуальная непереносимость препарата	0	0	NA

Примечание: группа I - положительный эффект от терапии, группа II - отсутствие эффекта, для проверки однородности групп I и II использовали критерий хи-квадрат ($p < 0,05$).

Данные исследования экспрессии генов рецепторов mER, PR-A, AR и GR в МНФК пациенток с миомой матки до лечения и после терапии мифепристоном в зависимости от эффекта терапии представлены на диаграмме (диаг. 2).

Из представленных на диаграмме данных видно, что у пациенток с отсутствием эффекта от терапии (группа II) практически не снижается уровень PR-A после проведенного курса лечения, в отличие от пациенток I группы. Полученные данные подтвердили нашу гипотезу об участии иммунокомпетентных клеток в инволюции опухоли под действием мифепристона. Таким образом, лечебное действие мифепристона сопровождается изменением рецепторного профиля иммунокомпетентных клеток периферической крови пациенток с миомой матки. Средние значения уровня мРНК всех изученных рецепторов в МНФК у пациенток II группы (без эффекта) до лечения превышают значения аналогичных данных пациенток группы I в 1,5 раза (диаг. 2).

Диаграмма 2. Уровень экспрессии генов стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови пациенток до и после лечения мифепристоном в зависимости от эффективности терапии (Me, мРНК, о.е. $10^3 * 0,5^{\Delta Ct}$).

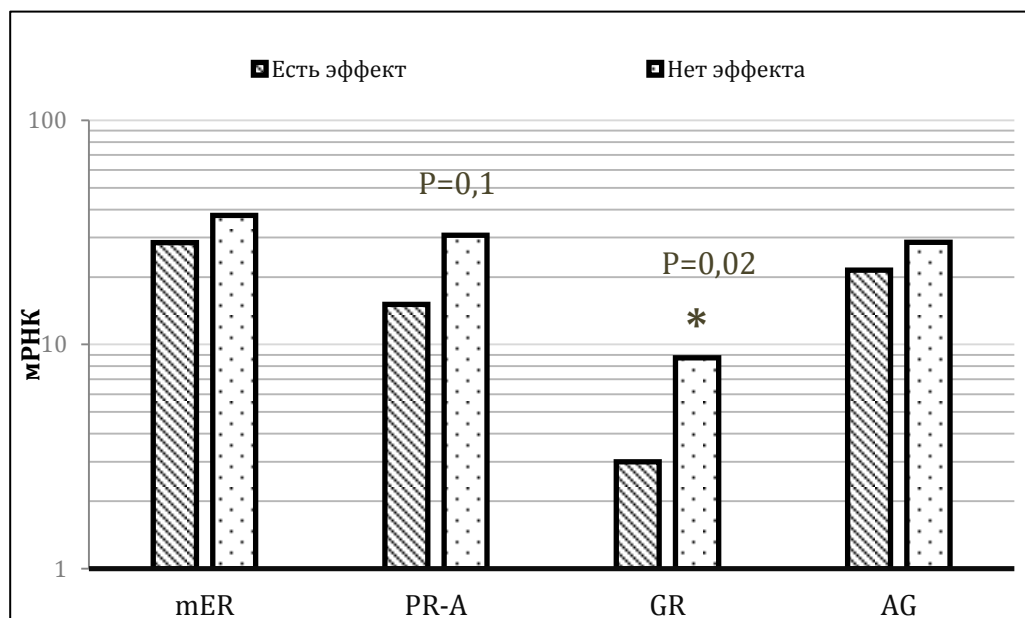


*Примечание: группа I – пациентки с положительным эффектом от терапии мифепристоном, группа II – пациентки с отсутствием эффекта от лечения мифепристоном; * - достоверные различия с аналогичным параметром до лечения (Вилкоксон)*

Следовательно, параметры стероидного транскриптома клеток крови можно использовать в качестве маркеров прогноза эффективности применения мифепристона у пациенток с миомой матки.

Для поиска маркера эффективности применения мифепристона в лечении пациенток с миомой матки был проанализирован уровень экспрессии генов рецепторов половых стероидов в мононуклеарах пациенток в точке «до» лечения. Результаты сравнительного анализа уровня мРНК генов стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки до начала лечения в зависимости от эффективности последующей терапии мифепристоном представлены на диаграмме 3.

Диаграмма 3. Уровень экспрессии генов стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови пациенток до лечения мифепристоном в зависимости от эффективности последующей терапии (Me, мРНК, о.е., $10^3 * 0,5^{\Delta Ct}$).



*Примечание: mER – мембранный рецептор эстрадиола, PR-A – ядерный рецептор прогестерона типа A, GR – ядерные рецепторы глюкокортикоидов, AR – ядерные рецепторы андрогенов. Ген сравнения GAPDH, * - достоверные различия с аналогичным параметром в группе пациенток с положительным эффектом от терапии мифепристоном (Манн-Уитни).*

Из представленной диаграммы видно, что в МНФК пациенток с отсутствием эффекта мифепристона в отношении размеров миомы, выявлена повышенная экспрессия генов ядерных глюкокортикоидных рецепторов в 5 раз и тенденция к повышению экспрессии генов рецептора прогестерона PR-A ($p=0,1$) по сравнению с аналогичным параметром в МНФК пациенток из группы I. Уровень мРНК mER и AR не различался в МНФК пациенток этих групп. Следовательно, уровень экспрессии GR может служить маркером прогноза эффективности применения мифепристона в лечении пациенток с миомой матки.

Выявление вероятной зависимости между изученными параметрами потребовало табуляции непрерывной переменной данных эффективности терапии. Для этого мы провели перекодирование данных с разбивкой диапазона их изменения на небольшое число интервалов. В качестве основного параметра эффективности терапии использовали степень уменьшения объема опухоли от первоначальных значений в процентах. Весь диапазон эффектов был расчленен на три интервала: «высокая эффективность» - уменьшение размеров миоматозных узлов к завершению лечения от 40% до 100%, «средняя эффективность» - уменьшение размеров миоматозных узлов от 20 % до 40 % и «низкая эффективность» - уменьшение размеров узлов менее чем на 20 %.

В соответствии с такой табуляцией, у 40% пациенток с множественной лейомиомой матки в нашем исследовании наблюдали высокую эффективность лечения, у 32% - среднюю эффективность лечения и у 14% обнаружен низкий терапевтический эффект мифепристона. Отсутствие терапевтического действия мифепристона на размеры миоматозных узлы выявили у 14% пациенток (диаг. 4).

Корреляционный анализ экспериментальных данных с параметрами эффективности антигормональной терапии показал, что экспрессия GR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки (до начала лечения) имеет отрицательную корреляционную связь с успехом последующей терапии мифепристоном (CI 95% Spearman $r = - 0,46$; $p=0,02$).

Для изучения характеристик потенциального маркера прогноза эффективности применения мифепристона в терапии пациенток с миомой матки проведен ROC-анализ. Выявлено, что увеличение уровня экспрессии гена GR более 0,011 о.е. в клетках МНФ крови у женщин может свидетельствовать о снижении эффективности мифепристона в лечении миомы матки. Чувствительность данного маркера составляет 78%, специфичность 70% (AUC = 0,78; «хорошая» значимость теста).

Диаграмма 4. Эффективность терапии мифепристоном пациенток с миомой матки.



Примечание: высокая эффективность лечения (уменьшение размеров миоматозных узлов > 40%), средняя эффективность лечения (уменьшение размеров миоматозных узлов от 20 % до 40 %), низкий терапевтический эффект (уменьшение размеров миоматозных узлов < 20 %).

4. Оценка частоты встречаемости железистой дилатации эндометрия у пациенток в терапии миомы матки мифепристоном.

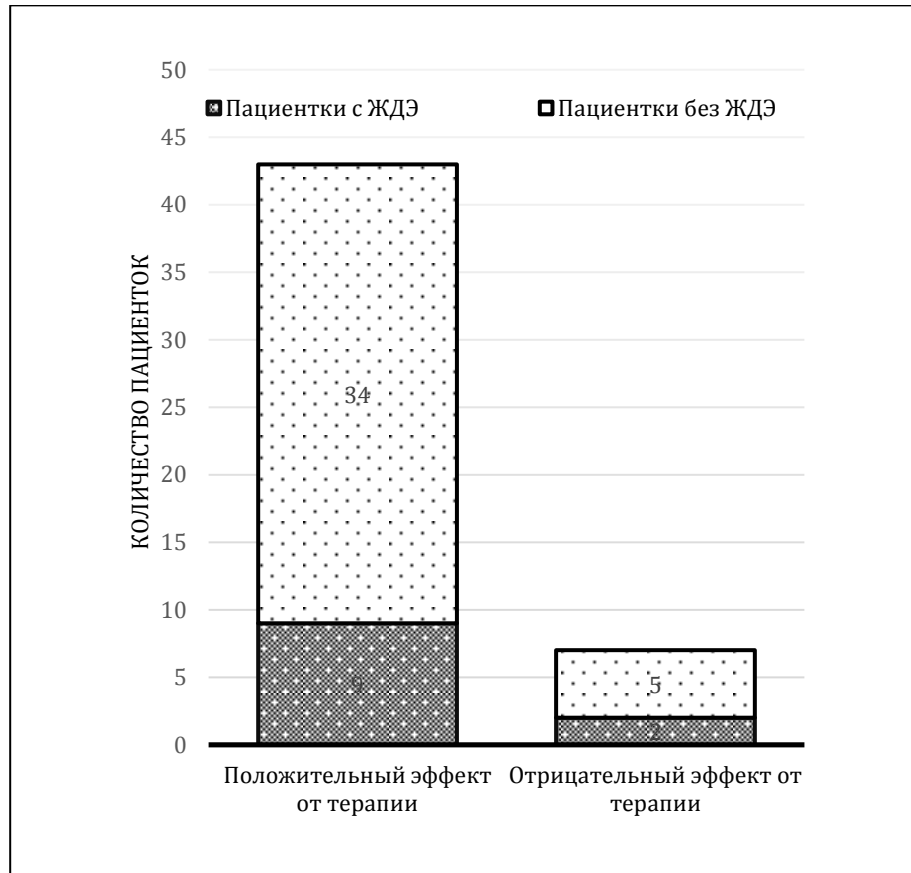
Безопасность лечения оценивали на основании регистрации нежелательных явлений путем анализа жалоб, симптомов. Контролировали толщину эндометрия при помощи УЗ – исследования, фиксировали степень выраженности его изменений.

Железистая дилатация эндометрия (ЖДЭ) была выявлена у 11 из 50 (22%) пациенток, получавших лечение мифепристоном. В результате морфологического исследования биопсий эндометрия пациенток с железистой дилатацией ни одного случая атипической гиперплазии не было выявлено. Полученные данные сходны с международной статистикой клинического применения мифепристона в терапии миомы матки [Esteve J.L., 2013; Engman M., 2009; Carbonell J.L., 2013].

Для изучения взаимосвязи между наличием/отсутствием железистой дилатации эндометрия у пациенток и показателями эффективности терапии мифепристоном миомы матки был проведен анализ сопряженности исследуемых параметров при помощи критерия Хи-квадрат.

Статистическая обработка данных показала, что проявление железистой дилатации эндометрия у пациенток не связано с эффективностью лечения (Хи-квадрат = 0,02; $p = 0,86$) (диаг. 5). Таким образом, полученные нами результаты подтверждают данные отечественных и международных клинических исследований. Так, эффективность лечения миомы СМРП в среднем составляет 85-95%, тогда как частота РАЕС – от 15 до 30% [Horne F.M., 2007].

Диаграмма 5. Эффективность мифепристона в терапии пациенток с миомой матки и частота проявления железистой дилатации эндометрия.



Примечание: ЖДЭ – железистая дилатация эндометрия, Хи-квадрат = 0,02; p=0,8.

5. Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток и частоты встречаемости мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у женщин с миомой матки.

Для оценки влияния мифепристона на экспрессию генов рецепторов стероидных гормонов в клетках МНФ крови пациенток, в зависимости от наличия или отсутствия железистой дилатации эндометрия, разделили на две группы: I - пациентки без ЖДЭ, II- пациентки с ЖДЭ.

Для исключения возможного влияния внешних факторов на результаты исследования был проведен анализ признаков генеральной совокупности при помощи метода Хи-квадрат (табл. 2). Статистическая обработка данных показала отсутствие достоверных отличий в группах.

Таблица 2.

Клинические и антропометрические характеристики групп пациенток с наличием железистой дилатации эндометрия и без таковой (Mean± SE).

Параметры	I Пациентки без ЖДЭ	II Пациентки с ЖДЭ	p
Количество пациенток	39	11	0,0001*
Возраст пациенток	43±4,7	42±3,4	0,1
ИМТ пациенток	25±4,1	25±4,0	0,3
Патология сердечно-сосудистой системы	0	0	NA
Патология щитовидной железы	1	0	1,0
Патология мочевыделительной системы	0	0	NA
Индивидуальная непереносимость препарата	0	0	NA

Примечание: ЖДЭ – железистая дилатация эндометрия, для проверки однородности групп I и II использовали критерий хи-квадрат ($p < 0,05$)

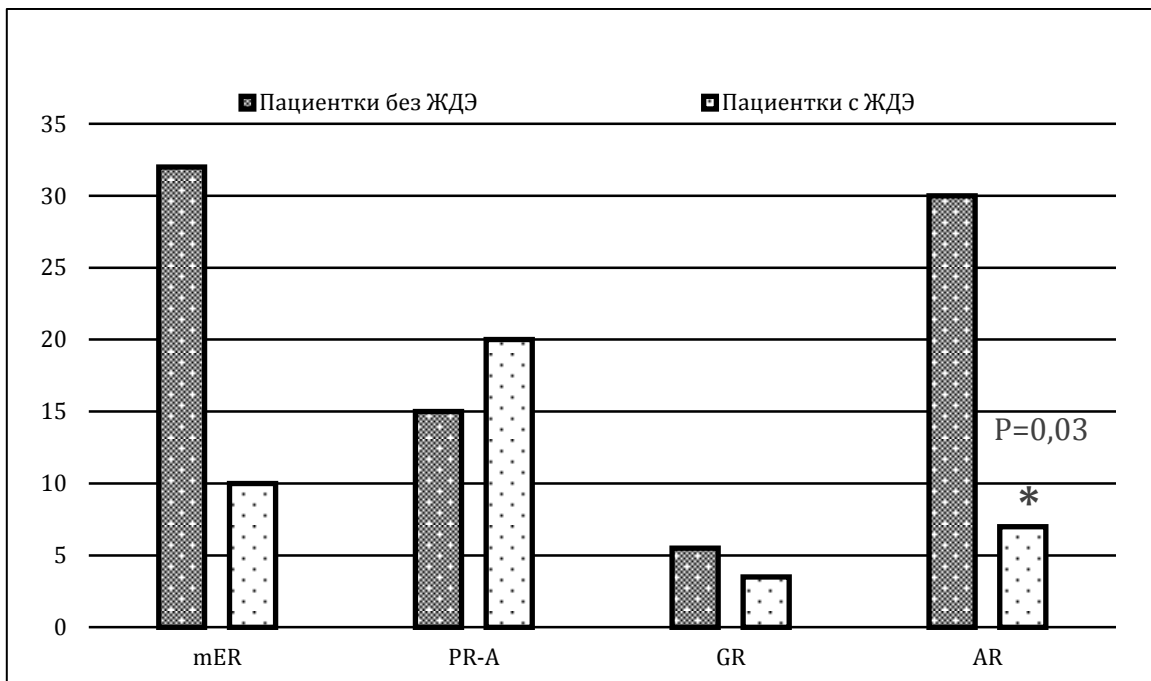
Результаты исследования экспрессии генов рецепторов mER, PR-A, AR и GR в мононуклеарной фракции клеток крови пациенток с миомой матки с изменениями эндометрия, ассоциированными с терапией мифепристоном и без таковых представлены на диаграмме (диаг. 6).

Как видно из данных диаграммы в клетках МНФ крови пациенток с измененным эндометрием на фоне применения мифепристона выявлено снижение экспрессии генов ядерных рецепторов андрогенов в 3,7 раз ($p=0,03$) по сравнению с аналогичным параметром в мононуклеарах пациенток с неизменным эндометрием. Уровень мРНК mER, PR-A и GR в мононуклеарных клетках пациенток не зависел от состояния эндометрия. Следовательно, уровень экспрессии AR может служить маркером прогноза развития ЖДЭ у пациенток с миомой матки на фоне терапии мифепристоном.

Корреляционный анализ экспериментальных данных с частотой встречаемости специфических изменений эндометрия на фоне лечения мифепристоном показал, что экспрессия гена AR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки (до начала лечения) имеет отрицательную корреляционную связь с развитием ЖДЭ (CI 95% Spearman $r = -0,37$; $p=0,04$).

Для изучения характеристик потенциального прогностического маркера развития ЖДЭ у пациенток на фоне лечения мифепристоном был проведен ROC-анализ. Выявлено, что снижение уровня экспрессии гена AR менее 0,028 о.е. в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток может свидетельствовать о высокой вероятности развития железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки на фоне терапии мифепристоном. Чувствительность данного маркера составляет 90%, специфичность 50% (AUC = 0,74 - «хорошая» значимость теста).

Диаграмма 6. Уровень экспрессии генов стероидных рецепторов в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки в зависимости от наличия или отсутствия железистой дилатации эндометрия (Ме, мРНК, о.е. $10^3 \cdot 0,5^{\Delta Ct}$).



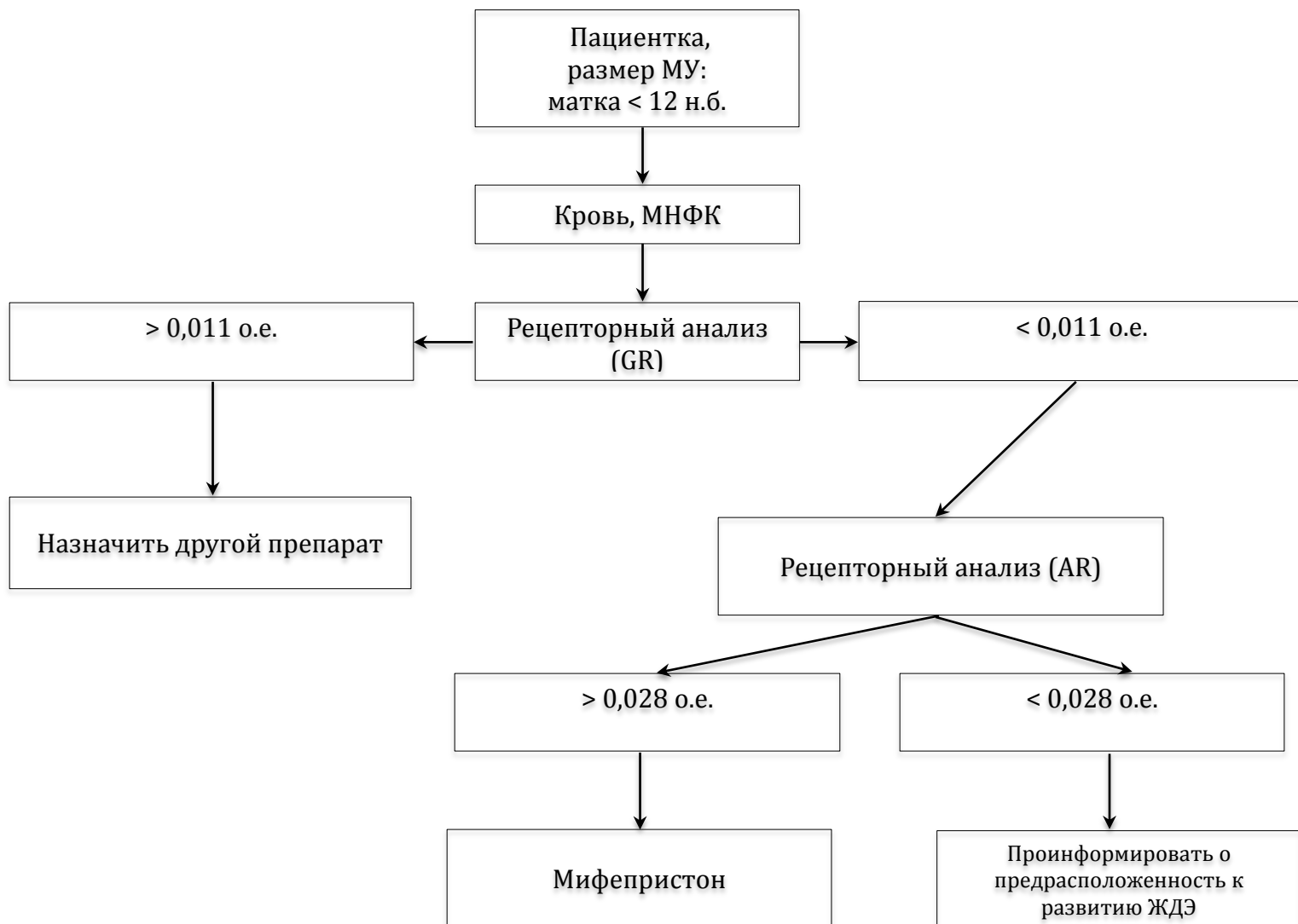
*Примечание: ЖДЭ – железистая дилатация эндометрия, mER – мембранный рецептор эстрадиола, PR-A – ядерный рецептор прогестерона типа A, GR – ядерные рецепторы глюкокортикоидов, AR – ядерные рецепторы андрогенов. Ген сравнения – GAPDH, * - достоверные различия с аналогичным параметром до лечения (Манн-Уитни)*

Недостаточная информированность специалистов и пациентов о значении ЖДЭ на фоне лечения мифепристоном может привести к ошибочной тактике ведения женщин с миомой матки (необоснованный отказ), снижению комплаентности и, как следствие, неэффективности лечения. Вызванные

изменения эндометрия всегда обратимы и самостоятельно регрессируют уже через месяц после отмены препарата. Анализ показанных нами характеристик поможет выявить пациенток с риском развития железистой дилатации эндометрия, позволит проинформировать врача и пациентку и, как следствие, предупредить необоснованные оперативные вмешательства (гистероскопия и резекция), являющиеся дополнительным фактором риска для репродуктивного здоровья женщины.

На основании результатов диссертационной работы был создан алгоритм персонализированного назначения мифепристона (50 мг внутрь ежедневно, 3 месяца) пациенткам для лечения миомы матки (рис. 2).

Рисунок 2. Алгоритм персонализированного назначения мифепристона (50 мг внутрь ежедневно, 3 месяца) пациенткам с миомой матки.



Примечание: МУ – миоматозный узел, МНФК – мононуклеарная фракция клеток крови, GR – ядерные рецепторы глюкокортикоидов, AR - ядерные рецепторы андрогенов, ЖДЭ – железистая дилатация эндометрия, о.е. – относительные единицы.

ВЫВОДЫ

1. Мифепристон (50 мг внутрь ежедневно, 3 месяца) вызывает регрессию миоматозных узлов у 86% пациенток. По данным УЗИ уменьшение размеров миомы матки в среднем составило 44%.
2. Относительная экспрессия генов рецепторов mER, PR-A, GR, AR в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с миомой матки на 19-21 день м.ц. составила $0,028 \pm 0,001$, $0,018 \pm 0,005$, $0,017 \pm 0,006$, $0,02 \pm 0,005$ (Me \pm SE, о.е.), соответственно.
3. Мифепристон (50 мг внутрь ежедневно, 3 месяца) снижает экспрессию гена ядерного рецептора прогестерона типа A в 9,8 раз ($p=0,01$) в мононуклеарной фракции клеток крови пациенток, при этом уровень мРНК mER, GR и AR достоверно не изменяется.
4. У пациенток с отсутствием эффекта мифепристона в отношении размеров миомы в мононуклеарных клетках крови выявлена повышенная экспрессия генов ядерных глюкокортикоидных рецепторов в 5 раз ($p=0,002$) по сравнению с аналогичным параметром у женщин с положительным результатом лечения. Экспрессия генов GR в мононуклеарах пациенток с миомой матки (до начала лечения) имеет отрицательную корреляционную связь с успехом последующей терапии мифепристомом (Spearman $r = - 0,46$; $p=0,02$) и может быть использована с прогностической целью (пороговое значение в о.е., чувствительность – 78%, специфичность – 70%).
5. Железистая дилатация эндометрия на фоне лечения мифепристомом (50 мг, внутрь, 3 месяца) была выявлена у 11 из 50 (22%) пациенток, и не ассоциирована с эффектом терапии (Chi-квадрат = 0,02; $p = 0,86$).
6. В мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с железистой дилатацией эндометрия (до начала лечения) снижена

экспрессия генов AR в 3,7 раз ($p=0,03$) по сравнению с аналогичным параметром у женщин с неизменным эндометрием. Уровень мРНК AR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки имеет отрицательную корреляционную связь с вероятностью развития железистой дилатации эндометрия (Spearman $r = - 0,37$; $p=0,04$), и может быть использован с диагностической целью (пороговое значение в о.е, чувствительность – 90%, специфичность – 50%).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бехбудова, Л.Х. Влияние мифепристона на экспрессию рецепторов эстрадиола альфа в мононуклеарах периферической крови пациенток репродуктивного возраста / Л.Х. Бехбудова, А.Е. Маняхина, О.С. Горенкова // **Вестник Российского государственного медицинского университета. Специальный выпуск. – 2013. – № 1. – С. 258.**
2. Бехбудова, Л.Х. Рецепция половых стероидов в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки/ Л.Х. Бехбудова, Е.Н. Карева, О.С. Горенкова // **Здоровье и образование в XXI веке Журнал научных статей. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 1-3.**
3. Бехбудова, Л.Х. Влияние мифепристона на экспрессию генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках крови пациенток с миомой матки / Л.Х. Бехбудова, Е.Н. Карева // **Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 660.**
4. Бехбудова, Л.Х. Персонализированный подход в назначении мифепристона пациенткам с миомой матки / Е.Н. Карева, Л.Х. Бехбудова, Т.Е. Самойлова, О.С. Горенкова // **Акушерство и гинекология. – 2015. – № 5. – С. 61-65.**
5. Бехбудова, Л.Х. Экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани полипов эндометрия у пациенток в пре- и постменопаузе / Е.Н. Карева, Д.А. Тихонов, Л.Х. Бехбудова, Т.Н. Ивановская, В.Г. Бреусенко // **Молекулярная медицина.– 2015. – №4. – С. 11-16.**
6. Бехбудова, Л.Х. Особенности транскриптома рецепторов стероидных гормонов мононуклеарных клеток периферической крови пациенток с изменениями эндометрия, ассоциированными с модулятором рецепторов прогестерона / Л.Х. Бехбудова, Е.А. Федорова, Е.Н. Карева, О.С. Горенкова // **Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – Приложение. – С. 10.**

7. Бехбудова, Л.Х. Половые гормоны, цитокины и апоптоз в патогенезе миомы матки / Е.Н. Карева, Н.А. Коцюбинская, Л.Х. Бехбудова, Ю.К. Наполов // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 3-15.
8. Бехбудова, Л.Х. Эстрогены и иммунная система / Е.Н. Карева, Н.А. Коцюбинская, Л.Х. Бехбудова, Ю.К. Наполов, Д.А. Тихонов, П.П. Акимов // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, №11. – С. 18-37.
9. Бехбудова, Л.Х. Прогестерон и иммунная система / Е.Н. Карева, Д.А. Тихонов, Т.Н. Ивановская, Л.Х. Бехбудова, Н.А. Коцюбинская // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2014. –Т. 18, № 11. – С. 3-9.
10. Бехбудова, Л.Х. Эффективность терапии мифепристоном пациенток с миомой матки и экспрессия генов глюкокортикоидных рецепторов в моноклеарной фракции клеток крови / Л.Х. Бехбудова, Е.Н. Карева, О.С. Горенкова // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова «Достижения современной фармакологической науки.» – 2015. – С. 32-36.
11. Bekhbudova, L. Estradiol and progesterone receptors gene expression in endometrial polyp's tissue of pre- and postmenopausal patients. / V. Breusenko, E. Kareva, L. Bekhbudova, N. Kotsyubinskaya, T. Ivanovskaya, Yu. Golova, O. Mishieva, G. Goluhov // International Journal of Gynecology and Obstetrics. – 2015. – Supplement 5. – P. 167.
12. Bekhbudova L. P0218: New mechanism of antiproliferative mifepristone effects in uterine myoma patients / E. Kareva, L. Bekhbudova, O. Gorenkova, T. Samojlova, V. Breusenko // International Journal of Gynecology and Obstetrics. – 2015. – № 131. – Supplement 5. – P. E377-8.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AR – ядерные рецепторы андрогенов

GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GR – ядерные рецепторы глюкокортикоидов

mER – мембранный рецептор эстрадиола

РАЕС – Progesterone Receptor Modulators Associated Endometrial Changes - изменения эндометрия, ассоциированные с терапией модуляторами рецепторов прогестерона, в русскоязычном варианте – «Железистая дилатация эндометрия» (ЖДЭ)

PR-A – ядерный рецептор прогестерона типа А

аГнРГ – агонисты гонадотропин релизинг гормона

ЖДЭ – железистая дилатация эндометрия

ИМТ – индекс массы тела

ЛС – лекарственное средство

МНФК (МНФ) – моноклеарная фракция клеток периферической крови

МУ – миоматозный узел

н.б. – неделя беременности

СМРП – селективные модуляторы рецепторов прогестерона