

ГУТОВА ДИНА СЕРГЕЕВНА

**РЕЦЕПТОРЫ ЭНДОМЕТРИИ И МОНОНУКЛЕАРОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОМ ОСНОВАНИИ
ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ПРОЦЕССАМИ
ЭНДОМЕТРИИ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ**

3.1.4 - Акушерство и гинекология

3.3.6 - Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Бреусенко Валентина Григорьевна
Карева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Ашрафян Лев Андреевич**
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора, директор института онкогинекологии и маммологии

доктор медицинских наук, профессор **Якушева Елена Николаевна**
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии с курсом фармации ФДПО лечебного факультета, заведующая кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в 14.00 на заседании Диссертационного совета 21.2.058.08 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте: www.rsmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Хашукоева Асият Зулчифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В структуре гинекологических проблем периода постменопаузы ведущую роль занимают пролиферативные процессы эндометрия (ППЭ), в частности, рак тела матки, который занимает в этой возрастной группе второе место по распространенности после рака молочной железы (Козаченко В.П., 2016; Савельева Г.М. и соавт., 2017; Каприн А.Д. и соавт., 2020; Guideline, 2016; UK Uterine cancer statistics, 2019). Все варианты ППЭ (полипы эндометрия, гиперплазия эндометрия с атипией и без) заслуживают особого внимания с позиции профилактики, поскольку устранение их может способствовать предупреждению развития ракового процесса (Коган Е.А. и соавт., 2018; Ашрафян Л.А. и соавт., 2019; Чернуха Г.Е. и соавт., 2020). Поэтому ранняя диагностика, патогенетически обоснованная терапия всех ППЭ является важнейшим этапом в снижении заболеваемости и смертности от злокачественных заболеваний эндометрия (Думановская М.Р. и соавт., 2021).

Современные подходы к лечению доброкачественных заболеваний эндометрия у пациенток этой возрастной группы включают в себя хирургическое удаление патологического очага (Бреусенко В.Г. и соавт., 2019), вопрос о гормональной терапии остается дискуссионным.

Степень разработанности научной темы

В настоящее время большое количество работ посвящается патогенезу ППЭ: гормональному статусу, включая рецепторную функцию, процессам апоптоза (Бреусенко В.Г. и соавт., 2016; Коган Е.А. и соавт., 2018; Чернуха Г.Е. и соавт., 2020). Существующие работы в литературе по исследованию экспрессии рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани ППЭ в постменопаузе немногочисленны и противоречивы. Большинство работ основано на использовании качественного метода диагностики - иммуногистохимии (Wang C. et al., 2020).

Иммунные механизмы патогенеза изучали при аденокарциноме эндометрия, оценивая степень инфильтрации ткани опухоли Т-хелперами и Т-киллерами, и определяя их соотношение (Patel M.V. et al., 2021), при этом выводы авторов не

однозначны. С вышеуказанных позиций заслуживают внимание работы, посвященные изучению половых стероидных гормонов и моноклеарной фракции крови (МНФК), отражающую один из аспектов иммунного статуса пациентки (Navarro F.C. et al., 2018). Работы по сопоставлению гормонального и иммунного профилей проведены у здоровых доноров, в которых было продемонстрировано, что для разных типов МНФК характерна экспрессия определенных типов рецепторов, с разным, иногда противоположным действием на клетки (Dama A. et.al., 2021). В период постменопаузы происходит физиологическое снижение уровня половых гормонов, одновременно с чем происходит изменение и в иммунных реакциях, например, в продукции цитокинов моноклеарными клетками, что может иметь значение при развитии злокачественных заболеваний (Dama A. et.al., 2021). Изучение этих факторов является важным у пациенток периода постменопаузы с ППЭ.

Цель исследования

Оценить роль экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и моноклеарной фракции периферической крови в возникновении пролиферативных процессов эндометрия у больных периода постменопаузы при патогенетическом обосновании выбора метода лечения.

Задачи исследования

1. У пациенток периода постменопаузы в ткани гиперплазии эндометрия с и без атипии, аденокарциномы эндометрия определить экспрессию генов рецепторов эстрадиола ($ER\alpha$, $ER\beta$, mER) и прогестерона (PRA , PRB , mPR , $PGRmC1$), используя в качестве группы контроля пациенток с железисто-фиброзными полипами эндометрия.
2. Определить экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в моноклеарной фракции периферической крови у пациенток периода постменопаузы с полипами, атипической гиперплазией, аденокарциномой эндометрия и у здоровых женщин этого же возраста (контрольная группа).
3. Сравнить показатели экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и в моноклеарной фракции

периферической крови у больных с пролиферативными процессами эндометрия в зависимости от характера патологического процесса.

4. Экспериментально (в условиях *ex vivo*) изучить влияние прогестерона и мифепристона на транскрипторно-рецепторный профиль моноклеаров периферической крови.
5. Разработать новые патогенетические подходы к лечению пролиферативных процессов эндометрия у пациенток постменопаузального периода.

Научная новизна исследования

На большом количестве наблюдений нами определена связь рецепторного профиля ткани эндометрия и МНФК при различных видах ППЭ у пациенток периода постменопаузы. При сопоставлении данных экспрессии генов рецепторов эстрадиола, прогестерона в ткани эндометрия и в МНФК выявлено совпадение их рецепторного профиля ER α и PRA, как основных факторов пролиферации и противодействия ей. При аденокарциноме эндометрия выявлены низкие показатели экспрессии указанных генов рецепторов, что свидетельствует о потере чувствительности и развитии автономности аденокарциномы эндометрия как от прямого влияния гормонов на ткань, так и от действия иммунной системы на нее.

У пациенток периода постменопаузы с атипической гиперплазией эндометрия нами выявлены высокие показатели экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона (ER α , mER, PRA) в МНФК, что, по-видимому, обуславливает их повышенную чувствительность к подавляющему влиянию эстрогенов и прогестерона. Экспериментально установлено угнетающее влияние мифепристона на экспрессию рецепторов эстрадиола и прогестерона в МНФК у пациенток периода постменопаузы с железисто-фиброзным полипом эндометрия. Это может явиться перспективным направлением в плане разработки новых схем лечения патологии эндометрия в постменопаузе.

Теоретическая и патогенетическая значимость работы

В ходе проведенного исследования определены механизмы патогенеза развития ППЭ, рецепторный статус патологической ткани эндометрия и моноклеарной фракции периферической крови и определены новые пути

подхода к патогенетической терапии ППЭ у пациенток постменопаузального периода.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное исследование с участием женщин постменопаузального периода с пролиферативными процессами эндометрия, у которых определялась экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани патологического эндометрия и в моноклеарной фракции периферической крови. В МНФК здоровых женщин без тяжелой соматической и гинекологической патологии определялась экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона. Проведено экспериментальное изучение влияния агонистов гестагенных рецепторов (прогестерон) и селективных модуляторов рецепторов прогестерона (мифепристон) на транскрипторно-рецепторный профиль моноклеаров периферической крови пациенток с железисто-фиброзным полипом эндометрия и здоровых женщин.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе наблюдается высокий уровень экспрессии всех прогестероновых (PRA, PRB, mPR, PGRmC1) и ядерных эстрогеновых ($ER\alpha$, $ER\beta$) рецепторов в ткани гиперплазии без атипии и низкий уровень в ткани аденокарциномы. Это отражает высокую гормональную чувствительность ткани гиперплазии без атипии и позволяет прогнозировать потенциальную эффективность гестагенов в качестве противорецидивных препаратов. Однако более высокие показатели экспрессии PRB в ткани аденокарциномы, не отличающиеся от показателей при атипической гиперплазии эндометрия, могут свидетельствовать о неоднозначном влиянии рецептора PRB на ткань различных вариантов пролиферативных процессов эндометрия. Следовательно назначение гестагенных препаратов может привести к непредсказуемому ответу ткани эндометрия и вызвать пролиферацию патологической ткани.
2. В моноклеарной фракции периферической крови пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе наблюдается выраженное увеличение экспрессии большинства генов рецепторов ($ER\alpha$, mER и

PRA) при атипической гиперплазии эндометрия и железисто-фиброзном полипе эндометрия (ER α , mPR) и снижение (ER α , ER β , PRA и mPR) при аденокарциноме эндометрия. Высокая экспрессия ER α , mER и PRA в моноклеарной фракции периферической крови при атипической гиперплазии эндометрия может предполагать подавление моноцитарно/макрофагального, Т-киллерного и NK-клеточного звеньев иммунитета и стимулировании Т-хелперного. Снижение экспрессии ER α , PRA и mPR в МНФК при аденокарциноме может говорить о прекращении реагирования иммунной системы (моноцитарно/макрофагального, NK-клеточного и Т-лимфоцитарного звеньев иммунитета) на пролиферацию опухолевой ткани. Выявленное выраженное снижение экспрессии ER β может характеризовать подавление опухолью В-клеточного звена иммунитета.

3. Экспрессия ER α и PRA в ткани эндометрия и в МНФК однонаправленная при всех видах пролиферативных процессов эндометрия. У пациенток с аденокарциномой это может свидетельствовать о потере чувствительности и развитии автономности опухолевой ткани, как от прямого влияния гормонов на ткань, так и от действия иммунной системы на нее. При атипической гиперплазии эндометрия выявлен высокий уровень экспрессии ER α и PRA в ткани эндометрия и в моноклеарах, что может подтверждать их повышенную гормональную чувствительность к эстрогенам и прогестерону.

4. Экспериментально показано, что «сильные» гестагены (медроксипрогестерон ацетат и норэтистерон ацетат) связываются с рецепторами МНФК в 2 раза слабее самого прогестерона и мифепристона, а значит меньше влияют на функцию МНФК. В эксперименте *ex vivo* показано, что мифепристон снижает экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в моноклеарах, способствуя уменьшению подавляющего влияния на них эндогенных половых стероидов. Одновременно мифепристон снижает и количество живых пролиферирующих, активно продуцирующих цитокины иммуннокомпетентных клеток. Все выше перечисленное диктует необходимость дальнейших исследований у пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в периоде постменопаузы для оценки иммуномодулирующего влияния мифепристона.

Степень достоверности результатов исследования

Статистический анализ данных проводился по общепринятым методам вариационной статистики с использованием пакета программ IBM® SPSS® Statistics 23.0.0.0. Использовали методы описательной статистики. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Стьюдента (t), а также при небольшой выборке использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми принимали результаты при значении $p < 0,05$.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции «Новации в медицине и фармакологии» (Рязань, 2018 г); XIII Международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2018 г) и XX Юбилейном Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2019» (Москва, 2019).

Апробация диссертации состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета, кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и сотрудников гинекологического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31» ДЗ г. Москвы (протокол №14 от «08» июня 2021).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе направления исследования, постановке цели и задач исследования. Диссертант лично проводил сбор анамнестических данных, клиническое обследование, подготовку к оперативному вмешательству и его проведение, сбор проб материала, участвовал в проведении лабораторных исследований. Автор самостоятельно проводил систематизацию полученных результатов, их статистическую обработку и анализ,

сформулировал выводы и практические рекомендации. Диссертант участвовал в подготовке к публикации печатных работ по теме научной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности

Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальностей: 3.1.4 - Акушерство и гинекология, конкретно пунктам 1, 3, 4 паспорта специальности; 3.3.6 - Фармакология, клиническая фармакология, конкретно пунктам 1, 2, 3 паспорта специальности.

Реализация и внедрение полученных результатов в практику

Результаты проведенной работы применяются в практической деятельности гинекологических отделений ГБУЗ ГКБ №31 (главный врач – к.м.н. Ефремова Н.М.) и ГБУЗ ЦПСИР ДЗМ г. Москвы (главный врач – к.м.н. Латышкевич О.А.). Результаты диссертационной работы используются в материалах для обучения студентов, аспирантов, курсантов ФУВ на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета и кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика РАМН Сергеева П.В. ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации по теме диссертации

По результатам проведенной работы опубликовано 6 работ, из них 1 - в рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК при Минобрнауки России и 2 - в базе данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 169 страницах печатного текста, включает 4 главы и состоит из обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и практических рекомендаций. В список использованной литературы вошло 264 источников, 39 из которых работы отечественных и 225 - зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками и 8 таблицами.

Материалы и методы исследования

Работа была проведена за период с 2012 по 2021 годы на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.Н. Пирогова Минздрава России (зав. кафедрой - академик РАН, профессор Курцер М.А.) на базе гинекологических отделений ГБУЗ ГКБ №31 г. Москвы (главный врач – к.м.н. Ефремова Н.М.), пациентки с аденокарциномой эндометрия взяты в обследование на базе онкогинекологического отделения ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» филиал №1 (главный врач – д.м.н. профессор Галкин В.Н.). Лабораторные исследования проводились на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика РАМН Сергеева П.В. ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (зав. кафедрой - д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Шимановский Н.Л.).

Согласно поставленной цели и задачам, обследованы 92 пациентки с различными вариантами ППЭ; из них с железисто-фиброзным полипом эндометрия (ЖФП) - 37, гиперплазией эндометрия без атипии - 7, атипической гиперплазией эндометрия - 8, умереннодифференцированной аденокарциномой эндометрия - 31, высокодифференцированной аденокарциномой эндометрия - 9.

Группу контроля для исследования экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия при ППЭ составили пациентки с ЖФП, учитывая низкую пролиферативную активность ткани.

При исследовании рецепторного профиля МНФК в контрольную группу были включены 10 женщин постменопаузального периода без гинекологической патологии. В эксперименте исследовано влияние агонистов гестагенных рецепторов и их селективных модуляторов на экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в МНФК у 5 пациенток с ЖФП и у 5 здоровых женщин.

Критерии включения: пролиферативные процессы эндометрия (железисто-фиброзный полип эндометрия, гиперплазия эндометрия с и без атипии, умеренно- и высокодифференцированная аденокарцинома эндометрия).

Критерии исключения: прием гормональных препаратов (эстроген-гестагены, гестагены, агонисты гонадотропин-релизинг гормона, заместительная гормональная терапия и тамоксифен) в течение 6 месяцев до проведения

исследования, гинекологические заболевания: миома матки, размерами более 6-7 недель беременности, патология придатков матки по данным УЗИ малого таза, воспалительные заболевания различной локализации на момент взятия материала.

Всего было обследовано 37 больных с ЖФП, из которых у 29 пациенток изучили рецепторный профиль в ткани эндометрия, у 21 - в МНФК, одномоментно у 13 из 37 пациенток с ЖФП было выполнено исследование рецепторного профиля в ткани эндометрия и МНФК. У 7 пациенток с гиперплазией эндометрия без атипии проведено исследование экспрессии генов рецепторов половых стероидов в ткани эндометрия. Из 8 пациенток с атипической гиперплазией эндометрия у 6 выполнено исследование рецепторного профиля в ткани эндометрия, у 5 - в МНФК. Одномоментное исследование в ткани эндометрия и в МНФК выполнено у 3 пациенток. Исследование экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани аденокарциномы эндометрия было выполнено у 31 пациентки с умереннодифференцированной и у 9 с высокодифференцированной аденокарциномой эндометрия, из них рецепторный профиль в МНФК был определен у 6 пациенток.

Всем пациенткам был выполнен стандартный протокол обследования, включающего в себя детальный сбор анамнеза, физикальное и гинекологическое обследование, методы лабораторной диагностики, УЗИ органов малого таза, при котором детально оценивалось М-эхо и состояние яичников. Гистероскопию выполняли с помощью жесткого гистероскопа фирмы «Storz» (Германия) по стандартной методике. Лапароскопическое и лапаротомическое удаление матки (экстирпация матки с придатками) проводили по стандартной методике.

Помимо общеклинического и гинекологического обследования, нами проводились так же и специальные методы диагностики.

Материал для исследования (ткань эндометрия) был взят в операционной сразу после оперативного вмешательства: у пациенток с ЖФП - при гистероскопии, отдельном диагностическом выскабливании слизистой матки, полипэктомии, (полип зеркально был разделен скальпелем от основания до ножки); у пациенток с гиперплазией эндометрия без и с атипией, аденокарциномой ткань была взята при проведении гистероскопии, отдельного диагностического выскабливания слизистой матки, а так же при экстирпации

матки с придатками лапароскопическим и лапаротомическим доступами сразу после выскабливания или удаления матки. Ткань эндометрия для исследования рецепторного профиля в удаленных матках была взята из разных точек стенок и дна матки. После забора ткань эндометрия помещали в крио пробирки Thermo scientific nunc Cryo Tube Vials 1,5 ml, маркировали и замораживали в жидком азоте.

Забор крови из локтевой вены для изучения рецепторного профиля МНФК производили натошак у всех обследованных до проведения оперативного вмешательства. Пробу крови помещали в стандартные пробирки Vacuum Blood Collection Tube обработанные лития гепарином и маркировали.

Получение мононуклеаров из периферической крови осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла («ПанЭко», Россия) по Boyum. Ткань эндометрия в полученных образцах размораживали при комнатной температуре.

Выделение мРНК из ткани эндометрия и МНФК проводили с помощью набора «Рибо-преп» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

Определение экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и МФНК проводили методом ПЦР исследования в реальном времени по стандартной методике, опубликованной в работах сотрудников кафедр (Мартиросян К.А., 2012; Коцюбинская Н.А., 2013; Тихонов Д.А., 2015; Ивановская Т.Н., 2017). В качестве контрольного гена использовался ген GAPDH.

В эксперименте определяли относительную связывающую активность рецепторов прогестерона в МНФК с гестагенами (за 100% принимали показания связывания с прогестероном), определяли рецепторный профиль МФНК здоровых женщин и пациенток с ЖФП после инкубации с прогестероном, мифепристоном и без использования препаратов в качестве группы контроля, а так же выживаемость мононуклеаров после инкубации методом МТТ-теста по стандартной методике.

Изучение специфического связывания прогестерона и мифепристона в мононуклеарной фракции проводили с помощью конкурентного радиолигандного анализа.

Инкубацию клеток с мифепристоном и прогестероном осуществляли в стерильных условиях – в ламинарном боксе («LS», Россия). Конечная концентрация в инкубационной среде мифепристона и прогестерона составила 3 мкМ. Клетки инкубировали при 37°C в условиях 5% CO₂ в течение 3-х суток.

Оценку жизнеспособности клеток (MTT-тест) проводили, используя «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Оптическую плотность контрольных образцов, в отсутствие исследуемых соединений, принимали за 100% жизнеспособность клеток. Погрешность измерения составила $\pm 0,007\%$.

Статистическая обработка. В результате анализа историй болезни пациенток с ППЭ была сформирована база исследования с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel 7,0 для Windows 2007 и Numbers версия 4.3 (5046) для MacBook Pro 2013. При анализе результатов осуществляли сравнение качественных и количественных признаков, характерных для изучаемых групп. Статистическая обработка результатов и построение диаграмм проводили с помощью: программного пакета GraphPad Prism версия 5.0 и программного пакета STATISTICA 8 фирмы StatSoftInc. Обработку данных выполняли с использованием критериев: критерий Фишера и критерий Mann-Whitney U test (достоверным считали различия с вероятностью не менее 95% или «p» менее 0,05).

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе проведенных исследований нами отмечено, что экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона зависит от характера ППЭ.

Известно, что **ER α** обладает пролиферативной активностью, а **ER β** - антипролиферативной (Miller M.M. et al., 2017).

Мы выявили высокие показатели экспрессии ER α и ER β в ткани гиперплазии эндометрия и низкие ER α в ткани аденокарциномы (Рисунок 1).

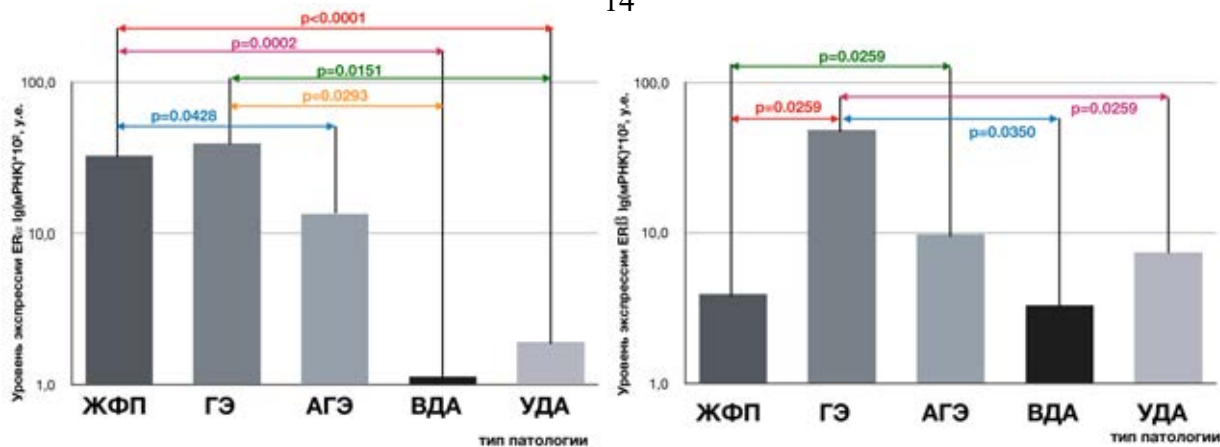


Рисунок 1 - Экспрессия генов ядерных рецепторов эстрадиола в ткани эндометрия в зависимости от характера пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - Ig уровня мРНК ($1/2-\Delta Ct$)* 10^2 , ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - ГЭ - гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ - атипическая гиперплазия эндометрия, УДА - умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА - высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия; p - уровень достоверности.

При более детальном анализе мы сравнили экспрессию генов рецепторов в ткани гиперплазии относительно показателей контрольной группы. И выявили что экспрессия гена рецептора ERα при гиперплазии эндометрия без атипии не отличается от показателей контрольной группы, при атипической гиперплазии ниже в 2,45 раза, а экспрессия ERβ в ткани гиперплазии без и с атипией достоверно выше экспрессии в контрольной группе в 2,46 (ЖФП/АГЭ) и 12,3 (ЖФП/ГЭ) раза соответственно.

Это свидетельствует о высокой чувствительности ткани гиперплазии эндометрия у пациенток в постменопаузе к эстрогенам, за счет ядерных рецепторов, в большей мере за счет ERβ. Указанное открывает новые возможности в изучении использования в качестве терапии гиперплазии эндометрия без атипии в периоде постменопаузы ингибиторов ароматазы (блок синтеза эстрогенов) или разработке новых препаратов селективных лигандов рецепторов ERβ.

В нашем исследовании экспрессия ядерных рецепторов прогестерона при гиперплазии эндометрия была высокой относительно показателей контрольной группы: **PRA** в 6,32 (ЖФП/АГЭ) и 15,14 (ЖФП/ГЭ) раза; **PRB** в 1,82 (ЖФП/АГЭ) и 7,94 (ЖФП/ГЭ) раза соответственно (Рисунок 2). Выявленные изменения

свидетельствуют о попытке компенсации чрезмерной пролиферации и недостаточности эндогенного гестагена, что патогенетически обосновывает назначение гестагенов при данных видах заболеваний.

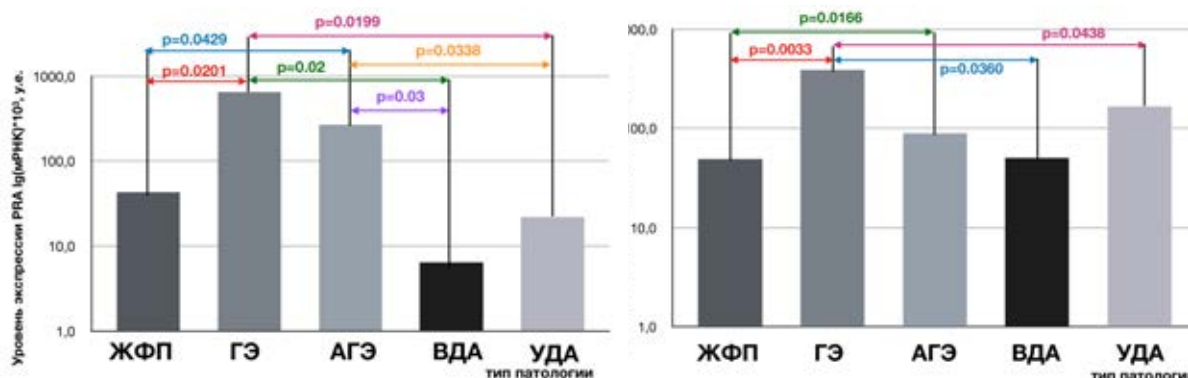


Рисунок 2 - Экспрессия генов ядерных рецепторов прогестерона в ткани эндометрия в зависимости от вида пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - Ig уровня мРНК $(1/2 \cdot \Delta Ct) \cdot 10^2$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - ГЭ - гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ - атипичная гиперплазия эндометрия, УДА - умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА - высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия; p - уровень достоверности.

При анализе экспрессии PRB в ткани аденокарциномы эндометрия мы выявили высокие показатели экспрессии, которые не отличались от показателей при атипической гиперплазии. Известно, что PRB обладает как атипролиферативным, так и пролиферативным действием (Dasgupta M. et.al, 2017). Следовательно, можно выдвинуть гипотезу о неоднозначном влиянии рецептора PRB на ткань различных вариантов ППЭ и назначение гестагенных препаратов может привести к непредсказуемому ответу ткани и вызвать пролиферацию вплоть до рака эндометрия. Указанное требует проведения индивидуального анализа рецепторного профиля удаленной ткани эндометрия каждой пациентке перед назначением синтетических гестагенов. При высоких показателях PRA назначение гестагенных препаратов возможно, в то время, как при высоких показателях экспрессии PRB назначение гестагенов опасно.

Мембранный рецептор прогестерона **mPR** активирует ядерный рецептор прогестерона B, обуславливая его эффекты (Weigel N.L. et.al, 2017). mPR и PRB могут обладать пролиферативной активностью. Мы выявили высокий уровень

экспрессии mPR в ткани гиперплазии эндометрия (в 12,55 (ЖФП/АГЭ) и 16,91 (ЖФП/ГЭ) раза), что является неблагоприятным фактором (Рисунок 3).

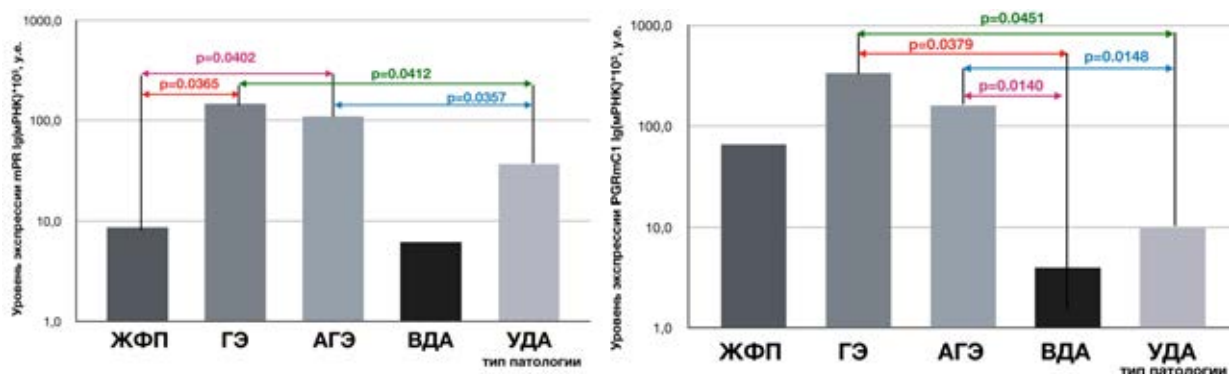


Рисунок 3 - Экспрессия генов мембранных рецепторов прогестерона в ткани эндометрия в зависимости от вида пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - Ig уровня мРНК $(1/2 \cdot \Delta Ct) \cdot 10^2$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - ГЭ - гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ - атипичная гиперплазия эндометрия, УДА - умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА - высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия; p - уровень достоверности.

Прогестерон при связывании с мембранным рецептором **PGRmC1** обладает выраженным пролиферативным действием, играет важную роль в канцерогенезе (Friel A.M. et.al, 2015). Мы выявили низкие показатели экспрессии этого рецептора в ткани аденокарциномы эндометрия по сравнению с тканью гиперплазии эндометрия в 16,22 (АГЭ/УДА), 39,95 (АГЭ/ВДА), 34,06 (ГЭ/УДА) и 83,87 (ГЭ/ВДА) раза соответственно (Рисунок 3), что свидетельствует о низкой агрессивности опухоли и нецелесообразности проведения гормональной терапии у этих больных.

В последние годы активно изучается влияние гормональной системы на иммунную (Campesi I. et.al., 2017).

Поэтому важным разделом работы явилось исследование экспрессии генов рецепторов половых стероидов в МНФК с целью изучения влияния гормональной системы на механизмы противодействия пролиферации.

Известно, что для разных клеток **МНФК** характерно преобладание экспрессии определенных типов рецепторов, с разным, иногда противоположным действием на клетки (Kovats S. et.al, 2015).

ER α - это основной тип рецепторов эстрадиола в моноцитах/макрофагах и Т-хелперах (Trenti A. et.al, 2018). Эстрадиол подавляет моноцитарно-макрофагальное и стимулирует Т-хелперное звенья иммунитета (Kovats S. et.al, 2015; Mohammad I. et.al., 2015). При анализе экспрессии рецептора ER α мы выявили его высокие показатели при атипической гиперплазии эндометрия в 13,45 раза по сравнению со здоровыми женщинами без гинекологической патологии (Рисунок 4), что свидетельствует о повышенной чувствительности МНФК при атипической гиперплазии эндометрия к подавляющему действию эстрадиола на моноцитарно-макрофагальное и стимулирующему на Т-клеточное звенья иммунитета. Подобное стимулирование Т-клеточного звена приводит к активации макрофагов и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, что может свидетельствовать о наличии хронического воспалительного процесса, который, как известно, является одним из патогенетических механизмов развития злокачественного процесса.

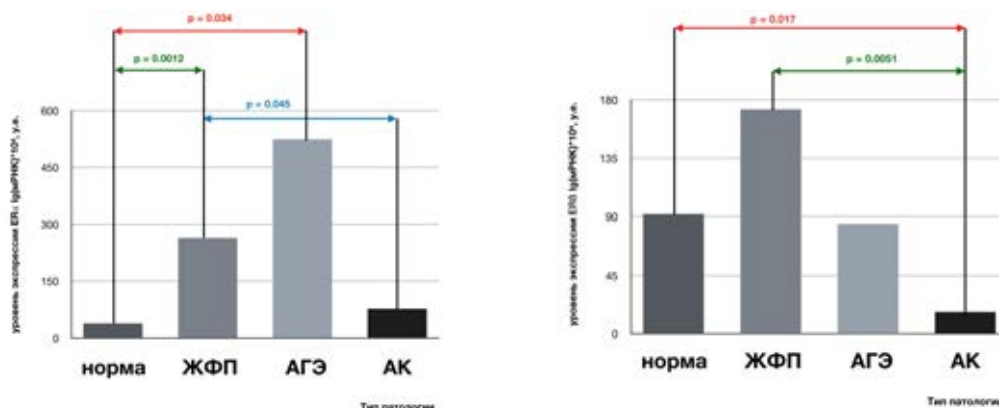


Рисунок 4 - Экспрессия ядерных рецепторов эстрадиола в МНФК в зависимости от вида пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - lg уровня мРНК (1/2-ΔCt)*10⁴, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - норма - здоровые женщины постменопаузального периода, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия, АГЭ - атипическая гиперплазия эндометрия, АК - аденокарцинома, p - уровень достоверности.

Низкие показатели экспрессии ER α у пациенток с аденокарциномой эндометрия, не отличающиеся от показателей контрольной группы, может свидетельствовать о попытке ухода опухоли от иммунного надзора.

Рецептор **ER β** является маркерным рецептором В-лимфоцитов, а также экспрессирован в моноцитах/макрофагах, где его роль незначительна (Mohammad I. et.al., 2015; Trenti A. et.al, 2018). В В-лимфоцитах эстрогены способствуют продуцированию антител и стимулируют выработку ряда антиапоптотических белков (Ladikou E.-E. et.al., 2018).

Мы выявили резкое снижение (практически отсутствие) показателей экспрессии рецептора ER β при аденокарциноме эндометрия (Рисунок 4) по сравнению со здоровыми и пациентками с ЖФП в 5,43 (здоровые/АК) и 10,2 (ЖФП/АК) раза. Это может свидетельствовать не просто о потере чувствительности опухоли к внешним сигналам, так как в этой ситуации скорее можно было бы ожидать значений экспрессии рецепторов, близких к нормальным, сколько о вторичном снижении вследствие подавляющего действия опухолевой ткани на В-клеточное звено иммунитета.

mER экспрессирован в моноцитах/макрофагах, но его активация, в отличие от ER α не влияет на их функцию (Pelekanou V. et.al., 2016).

В Т-киллерах экспрессия ядерных рецепторов эстрогенов очень низкая, но влияние эстрогенов на них описано (Navarro F.C. et.al., 2018). Это может предполагать участие мембранного рецептора в реализации эффектов эстрогенов на эти клетки. Navarro F.C. описали, что эстрадиол подавляет функцию Т-киллеров (Navarro F.C. et.al., 2018).

В нашем исследовании выявлены высокие показатели экспрессии mER при полипе и атипической гиперплазии эндометрия по сравнению с показателями здоровых женщин в 3,14 (ЖФП/здоровые) и 2,87 (АГЭ/здоровые) раза (Рисунок 5). Полученные результаты могут свидетельствовать о подавлении Т-киллерного иммунитета, являющимся первым звеном борьбы с опухолевой прогрессией, что при атипической гиперплазии может способствовать сохранению клона атипических клеток.

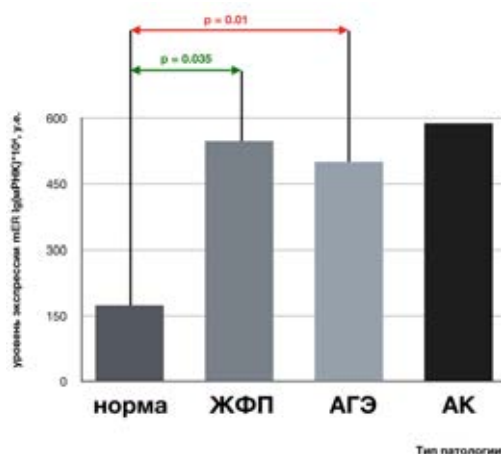


Рисунок 5 - Экспрессия mER в МНФК в зависимости от вида пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - lg уровня мРНК $(1/2-\Delta Ct) \cdot 10^4$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - норма - здоровые женщины постменопаузального периода, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия, АГЭ - атипическая гиперплазия эндометрия, АК - аденокарцинома, p - уровень достоверности.

Практически во всех типах МНФК ядерные рецепторы прогестерона не представлены и выявлены лишь в натуральных киллерах, что описано в работе L. Arruvito (Arruvito L. et.al., 2008). Прогестерон подавляет секрецию цитокинов натуральными киллерами (Arruvito L. et.al., 2008).

В нашем исследовании выявлен высокий уровень экспрессии ядерного рецептора прогестерона **PRA** в мононуклеарах (Рисунок 6), то есть натуральных киллерах, у пациенток с атипической гиперплазией эндометрия по сравнению с показателями здоровых женщин и пациенток с аденокарциномой эндометрия в 5,66 (АГЭ/АК) и 3,68 (АГЭ/здоровые) раза, что может означать повышение чувствительности натуральных киллеров к отрицательному действию прогестерона и так же способствовать прогрессии атипической гиперплазии эндометрия до аденокарциномы.

Низкий уровень экспрессии PRA в МНФК, обнаруженный нами у пациенток с аденокарциномой эндометрия (Рисунок 6), может свидетельствовать о молекулярном маскировании опухоли от действия натуральных киллеров.

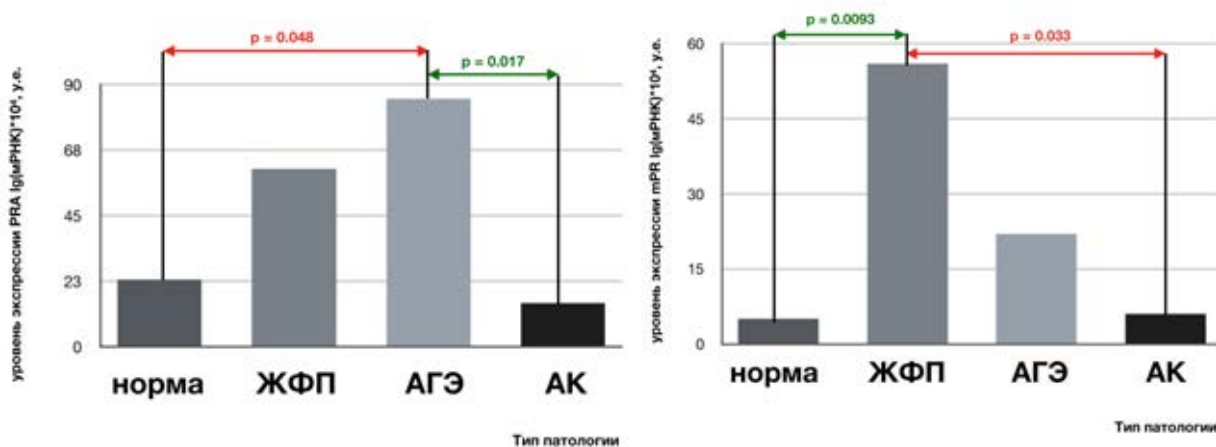


Рисунок 6 - Экспрессия генов рецепторов прогестерона PRA и mPR в МНФК в зависимости от вида пролиферативных процессов эндометрия

Примечание: ось ординат - $\lg$ уровня мРНК ($1/2 \cdot \Delta Ct$) $\cdot 10^4$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - норма - здоровые женщины постменопаузального периода, ЖФП - железистофиброзный полип эндометрия, АГЭ - атипическая гиперплазия эндометрия, АК - аденокарцинома, р - уровень достоверности.

Мембранный рецептор прогестерона **mPR** представлен в Т-лимфоцитах и прогестерон подавляет их действие (Chaouat G. et al., 2015). mPR экспрессирован так же в моноцитах/макрофагах и прогестерон стимулирует их, способствуя синтезу провоспалительных цитокинов (Polikarpova A.V. et.al., 2019).

В нашем исследовании экспрессия мембранного рецептора прогестерона mPR была высокая при полипе эндометрия в 11,24 (ЖФП/здоровые) и 9,32 (ЖФП/АК) раза, а при аденокарциноме статистически не отличалась от показателей здоровых женщин (Рисунок 6). По нашему мнению, это может свидетельствовать об отсутствии реакции этих звеньев иммунитета на развитие опухолевого процесса.

При сопоставлении данных экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и в МНФК мы выявили, что экспрессия генов рецепторов ER α и PRA совпадает. Эти типы рецепторов являются основными факторами пролиферации и противодействия ей. У пациенток с аденокарциномой эндометрия это может свидетельствовать о потере чувствительности и развитии автономности опухолевой ткани, как от прямого влияния гормонов на ткань, так и от действия иммунной системы на нее.

Значимо более высокие показатели экспрессии PRA при атипической гиперплазии в ткани эндометрия и в мононуклеарах могут указывать на их высокую гормональную чувствительность и обосновывают назначение гестагенов с целью снижения подавляющего эффекта прогестерона на МНФК и нормализации иммунного фона.

Для оценки этого предположения мы провели ряд экспериментальных исследований. Вначале мы оценили относительную связывающую активность рецепторов прогестерона в мононуклеарах с гестагенами и выявили, что «сильные» гестагены (медроксипрогестерона ацетат и норэтистерон) связываются с рецепторами прогестерона в 2 раза слабее, чем прогестерон (и мифепристон), это может говорить о неполном ответе мононуклеаров на синтетические

гестагены. Следовательно, для коррекции рецепторного профиля МНФК использование гестагенов, по нашему мнению, нецелесообразно.

Мифепристон - препарат, который активно связывается с рецепторами прогестерона в мононуклеарах (Meng-Die L. et al., 2020), и широко изучается в клинических исследованиях для лечения гормонзависимых патологических процессов (Lu Z.Z. et.al., 2016; Moravek M.B. et.al., 2018).

Мы использовали мифепристон, а не более современные селективные модуляторы прогестерона (улипристала ацетат, онапристон и пр.), потому что мифепристон не проявляет гепатотоксичность, обладает противоопухолевой и противометастатической активностью (Sang L. et.al., 2018).

В эксперименте мы инкубировали МНФК здоровых женщин и женщин с ЖФП с прогестероном, мифепристоном и без введения препаратов, в качестве группы контроля. После инкубации определяли экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона.

Анализируя полученные результаты, мы выявили, что у здоровых женщин мифепристон и прогестерон увеличивают экспрессию генов рецепторов эстрадиола за исключением ER β (Рисунок 7).

При патологии эндометрия при введении прогестерона экспрессия возрастала, а мифепристона снижалась (или не менялась в случае mER).

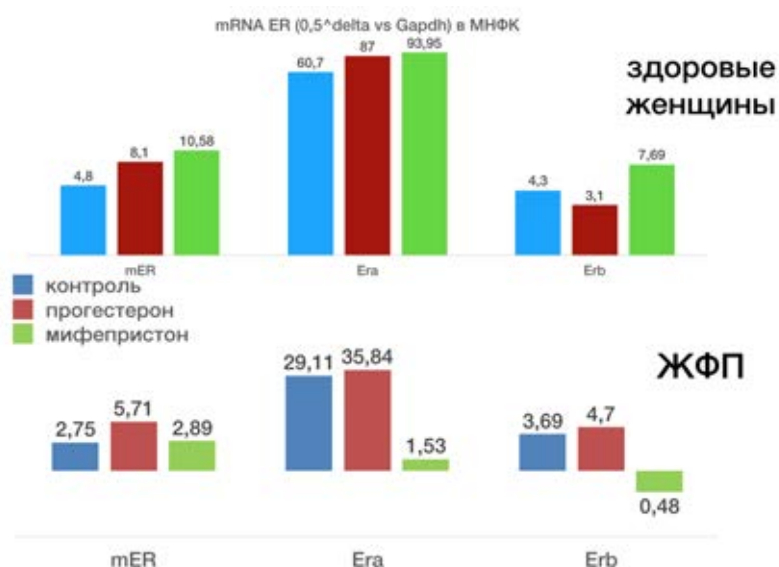


Рисунок 7 - Экспрессия рецепторов эстрадиола в МНФК здоровых женщин и пациенток с полипами эндометрия при инкубации с лигандами рецепторов прогестерона (lg1/2 Δ Ct)

Примечание: ось ординат - уровень мРНК $(1/2-\Delta Ct)*100$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - тип рецептора.

Экспрессия генов рецепторов прогестерона в МНФК у здоровых женщин и пациенток с патологией эндометрия отличалась. При инкубации с мифепристоном экспрессия генов рецепторов эстрадиола резко снижалась, что приводит к снижению чувствительности моноклеаров к действию прогестерона на МНФК (Рисунок 8). Это свидетельствует о целесообразности назначения данного препарата пациенткам с патологией эндометрия с целью снижения чувствительности МНФК к подавляющему действию прогестерона и нормализации иммунного фона.

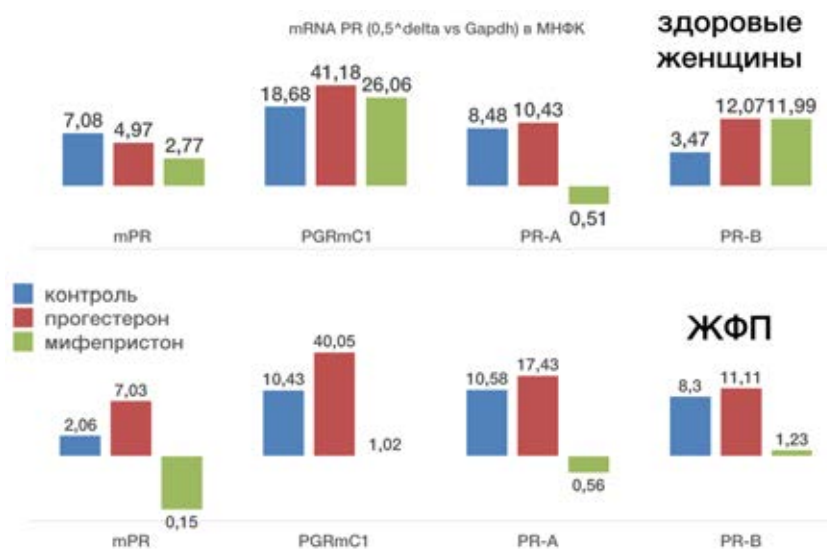


Рисунок 8 - Экспрессия рецепторов прогестерона в МНФК здоровых женщин и пациенток с полипами эндометрия при инкубации с лигандами рецепторов прогестерона ($lg1/2\Delta Ct$)

Примечание: ось ординат - уровень мРНК $(1/2-\Delta Ct)*100$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс - тип рецептора.

Однако, при изучении выживаемости клеток методом МТТ-теста при инкубации с мифепристоном мы обнаружили, что он снижает количество живых пролиферирующих, активно продуцирующих цитокины иммуннокомпетентных клеток, что отражает противовоспалительную активность мифепристона. Для подтверждения этих данных требуется проведение дальнейших исследований.

Таким образом, при определении патогенетически обоснованной гормональной терапии необходимо знание рецепторного и иммунного статуса. Только с учетом этих показателей дифференцировано должна назначаться гормональная и/или иммунная терапия.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе работы результаты открывают новые возможности в дальнейшей разработке новых патогенетических подходов к лечению ППЭ. Перспективным является проведение клинических исследований по определению рекомендаций к персонализированному лечению пациенток с ППЭ периода постменопаузы на основании данных экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани удаленного эндометрия. Тема исследования дает основу для дальнейшего исследования роли МНФК в патогенезе развития ППЭ.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток периода постменопаузы с пролиферативными процессами эндометрия экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия зависит от характера изменений. По сравнению с экспрессией у пациенток с железисто-фиброзными полипами (контрольная группа) при гиперплазии эндометрия без и с атипией определяется высокий уровень ER β (в 12,3 и 2,5 раза,) PR-A (в 15,1 и 6,3 раза), PR-B (в 7,9 и 1,8 раз), mPR (в 16,9 и 12,5 раза). У пациенток с атипический гиперплазией и аденокарциномой эндометрия выявлен низкий уровень экспрессии ER α (в 28-17 раз соответственно). Это свидетельствует о высокой гормональной чувствительности ткани гиперплазии эндометрия без и с атипией и низкой - ткани аденокарциномы.
2. В мононуклеарных клетках периферической крови у больных с пролиферативными процессами эндометрия периода постменопаузы по сравнению с показателями контрольной группы уровень экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона зависит от характера патологии эндометрия. При железисто-фиброзном полипе выявлен высокий уровень ER α (в среднем в 6,8 раз), mER (в 3,1 раза), mPR (в 11,2 раза); при атипической

гиперплазии эндометрия - ER α (в 13,4 раз), mER (в 2,9 раз), PR-A (в 3,7 раз), при аденокарциноме эндометрия - низкий уровень ER β (в 5,4 раз).

3. При сопоставлении данных экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и в моноклеарной фракции периферической крови при аденокарциноме выявлено синхронное снижение ER α и PR-A, что может указывать на подавление чувствительности опухоли как к прямому влиянию гормонов на ткань, так и действию иммунной системы на нее.

4. В эксперименте показано повышение экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в моноклеарной фракции периферической крови в ответ на прогестерон у пациенток с железисто-фиброзными полипами эндометрия в постменопаузе. Выявленное повышение экспрессии генов рецепторов влечет повышение чувствительности иммунокомпетентных клеток к тормозному действию половых стероидов. Мифепристон снижает экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в МНФК пациенток с железисто-фиброзными полипами эндометрия. Подавляющее действие мифепристона на транскрипторно-рецепторный профиль иммунокомпетентных клеток, потенциально способно снизить стероидное давление на иммунитет и оказаться патогенетически полезным в терапии пациенток с пролиферативными процессами эндометрия.

5. При определении целесообразности назначения гормональной терапии пациенткам с пролиферативными процессами эндометрия периода постменопаузы важно определять рецепторный профиль ткани эндометрия и моноклеарной фракции периферической крови. В качестве потенциально эффективного метода терапии может быть рекомендовано изучение применения ингибиторов ароматазы, селективных лигандов рецепторов прогестерона (мифепристон).

Практические рекомендации

У больных периода постменопаузы с гиперплазией эндометрия без и с атипией при выборе метода лечения и назначения гормональной терапии целесообразно исследование индивидуального профиля рецепторного статуса эстрадиола и прогестерона в ткани удаленного эндометрия. При наличии высоких

показателей PRA гормональная терапия гестагенными препаратами возможна, при высоких показателях PRB назначение синтетических гестагенов опасно и может привести к непредсказуемому ответу ткани и прогрессированию пролиферации.

Гормональная терапия аденокарциномы эндометрия у пациенток постменопаузального периода синтетическими гестагенами и ингибиторами ароматазы (низкие показатели экспрессии ER α , ER β в ткани аденокарциномы) нецелесообразна.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Гуторова, Д.С. Роль мембранных рецепторов эстрадиола в патогенезе пролиферативных процессов эндометрия в постменопаузе / Бреусенко В.Г., Карева Е.Н., Гуторова Д.С. // Материалы Международной научно-практической конференции «Новации в медицине и фармакологии». Федеральный центр науки и образования «Эвенсис». - Рязань, 2018 г. - №3 - С. 8-13
2. Гуторова, Д.С. Экспрессия генов рецепторов половых стероидов и факторов апоптоза в ткани атипической гиперплазии и аденокарциномы эндометрия у женщин в постменопаузе / Гуторова Д.С., Кочина Н.А., Величинский Р.А. // XIII Международная (XXII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых: сборник тезисов. - М., 2018 г. - С. 27
3. Гуторова, Д.С. Изучение роли экспрессии генов рецепторов эстрогенов и прогестерона в возникновении пролиферативных процессов в эндометрии для решения вопроса о тактике ведения больных с указанными патологическими изменениями эндометрия / Бреусенко В.Г., Карева Е.Н., Гуторова Д.С. // **Российский вестник акушера-гинеколога**. - 2018. - 18(6). - С.17-24
4. Гуторова, Д.С. Стероидно-рецепторный профиль моноклеаров периферической крови у пациенток в постменопаузе с пролиферативными процессами эндометрия / Бреусенко В.Г., Карева Е.Н., Гуторова Д.С. // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии**. - 2019. - 18(3). С. 80–86.
5. Гуторова, Д.С. Экспрессия генов рецепторов эстрогенов и прогестерона в моноклеарах периферической крови у пациенток в постменопаузе с пролиферативными процессами эндометрия / Бреусенко В.Г., Карева Е.Н., Гуторова Д.С. // XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя: сборник тезисов». - М., 2019, - С.118
6. Гуторова, Д.С. Мембранный рецептор прогестерона PGRMC1 - потенциальная мишень лекарственных средств / Карева Е.Н., Гуторова Д.С., Бреусенко В.Г. // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. - 2020. - Т. 83, №6. - С. 19-29