

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АНОМАЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ В ПЕРИМЕНОПАУЗЕ**Д. К. Нажмутдинова, Д. Т. Каюмова, У. А. Садуллаева, Д. Х. Ирнazarова, Г. З. Чориева**
Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан

Ключевые слова: перименопауза, гиперплазия эндометрия, аномальные маточные кровотечения, гены TNF-а, TP53, ER, PR, метаболический синдром.

Tayanch soʻzlar: perimenopauza, endometriya giperplaziyasi, bachadondan anomal qon ketish, TNF-a, TP53, ER, PR genlari, metabolik sindrom.

Key words: perimenopause, endometrial hyperplasia, abnormal uterine bleeding, TNF-a, TP53, ER, PR genes, metabolic syndrome.

Аномальные маточные кровотечения (АМК) в перименопаузе обусловлены чаще всего гормональным дисбалансом: относительной гиперэстрогенией и относительной гипопрогестеронемией, приводящих к развитию как доброкачественных – гиперпластических процессов эндометрия, так и раку эндометрия. Изучены клинические, морфологические, гистохимические, молекулярно-генетические признаки, которые помогли определить патогенетические звенья, факторы риска развития, прогрессирования и рецидива гиперплазии эндометрия у 120 пациенток 41-56 лет с АМК для обоснования не только индивидуального, но и персонализированного подхода к профилактике и лечению данной патологии в последующем.

PERIMENOPAUSA DAVRIDA BACHADONDAN ANOMAL QON KETISHINING PATOGENETIK MEXANIZMLARI**D. K. Najmutdinova, D. T. Kayumova, U. A. Sadulaeva, D. Kh. Irnazarova, G. Z. Chorlieva**
Toshkent tibbiyot akademiyasi, Toshkent, O'zbekiston

Perimenopauza davrda bachadondan anomal qon ketish ko'pincha gormonal muvozanatga bog'liq: nisbatan giperestrogeniya va nisbatan hipoprogesteronemiya, yaxshi sifatli – giperplastik endometriyadagi jarayonlar va endometria saraton rivojlanishiga olib keladi. Klinik, morfologik, histokimyoviy, molekulyar-genetik belgilar o'rganilib, patogenetik bog'lanishlar, rivojlanish uchun xavf omillari, 120 ta bemorda 41-56 yil davomida endometriy giperplaziyasining rivojlanishi va takrorlanishini aniqlashga yordam berdi, bu nafaqat shaxsiy, balki ushbu patologiyani oldini olish va davolashga moslashtirilgan yondashuvni ham asoslaydi.

PATHOGENETIC MECHANISMS OF ABNORMAL UTERINE BLEEDING IN PERIMENOPAUSE**D. K. Najmutdinova, D. T. Kayumova, U. A. Sadulaeva, D. Kh. Irnazarova, G. Z. Chorlieva**
Tashkent medical academy, Tashkent, Uzbekistan

Abnormal uterine bleeding (AUB) in perimenopause is most often caused by hormonal imbalance: relative hyperestrogenism and relative hypoprogesteronemia, leading to the development of both benign endometrial hyperplastic processes and endometrial cancer. Clinical, morphological, histochemical, molecular genetic signs were studied, which helped to identify pathogenetic links, risk factors for the development, progression and recurrence of endometrial hyperplasia in 120 41-56-year-old patients with AUB to justify not only an individual, but also a personalized approach to the prevention and treatment of this pathology in the future.

Во всем мире все большее количество научных исследований посвящается охране здоровья женщин пострепродуктивного периода, выявлению факторов риска развития патологического течения перименопаузы, разработке и выбору инновационных лечебно-профилактических мероприятий, основанных на принципе индивидуального подхода [5, 10, 11, 16, 17]. Проблема гиперпластических процессов эндометрия (ГПЭ) в перименопаузе остается предметом пристального интереса ввиду противоречивых иммуногистохимических, молекулярно-генетических, биохимических результатов и множества полученных маркеров, которые не позволяют однозначно прогнозировать течение, исход заболевания и обосновать вид терапии [8, 12, 13]. Кроме того, высокая частота рецидивов, отсутствие должной эффективности гормональной терапии, высокий риск малигнизации ГПЭ диктует необходимость совершенствования подхода к ее лечению [2, 12].

Признано, что развитие ГПЭ в перименопаузе - это естественное, соответствующее гормональному гомеостазу, состояние, тем не менее, ГПЭ диагностируется у 50-80% женщин и практически всегда сопровождается клиникой аномальных маточных кровотечений

(АМК) [9, 16]. В перименопаузе определено влияние развивающегося метаболического синдрома (МС) и отдельно его компонентов, а в частности ожирения, на предрасположенность развития и прогрессирования ГПЭ [7, 14] до рака эндометрия (в 2-50% случаев) [1, 2, 13, 14, 15]. До настоящего времени не выявлены универсальные молекулярно-генетические предикторы формирования ГПЭ, несмотря на большое количество публикаций, посвященных проблеме рецептивности эндометрия [3, 4, 6, 17]. Изучение клинко-патогенетических механизмов развития ГПЭ, чаще всего обуславливающих АМК в данном периоде женщин, позволит повысить уровень оказываемой им медицинской помощи.

Целью исследования явилось определение патогенетических механизмов развития ГПЭ, обуславливающих развитие АМК у женщин в перименопаузе.

В задачи исследования входило определение морфологических и гистохимических особенностей эндометрия у женщин с АМК в пери- и ранней постменопаузе, а также доказать патогенетическую значимость вариантов полиморфизма генов TP53, TNF-а, эстрогеновых (ER), прогестероновых рецепторов (PR) во взаимосвязи с метаболическими и воспалительными изменениями у женщин с АМК в пери- и ранней постменопаузе.

Нами были изучены клинические, морфологические, гистохимические, молекулярно-генетические признаки, которые помогли определить патогенетические звенья, факторы риска развития, прогрессирования и рецидива ГПЭ у 120 пациенток 41-56 лет с АМК для обоснования не только индивидуального, но и персонализированного подхода к профилактике и лечению данной патологии в последующем, они составили основную группу. Для определения факторов риска развития АМК были исследованы 522 женщины аналогичного возраста без АМК, которые составили контрольную группу.

Для достижения цели исследования **проведены** общеклиническое, гинекологическое и специальные методы исследований: морфологические, гистологические, гистохимические, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Всем женщинам основной группы проводили раздельное лечебно-диагностическое выскабливание/аспирацию эндометрия с последующим морфологическим и гистохимическим исследованием биоптатов, анализировали факторы рецидива и прогрессирования ГПЭ и в последующем определены молекулярно-генетические маркеры рецидивов ГПЭ.

Из биоптатов, полученных путем аспирации/выскабливания полости матки, готовили серийные срезы, окрашивали гематоксилином и эозином для проведения гистологических исследований, для определения различных структур - гистохимические исследования: коллагеновых волокон соединительной ткани – по Ван-Гизону, углеводы и мукополисахариды – ШИК-реакции. РНК - Унна-Браше, ДНК – Фельгена. Препараты визуализировали под светоптическим микроскопом МБИ-6 (Россия), Leica (Германия), окуляр микрометр-15 (ОМ).

Для определения специфичности генетических изменений и разработки персонализированной тактики ведения женщин с АМК проводили молекулярно-генетическое исследование. После забора образцов крови выделяли геномную ДНК из лимфоцитов периферической крови (Sambrook J. et al., 1989) с использованием набора реагентов «Рибо-преп» ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия, Москва), качество образцов ДНК проверялось на спектрофотометре NanoDrop 2000 «Thermo Scientific» (USA). Генотипирование полиморфизмов, локализованных в промоторных регионах, 4х генов: rs1800629I TNF-а в позициях, G-308A, гена, Arg72Pro гена TP53, а также G/A (rs2228480) гена ER и G/T (rs1042838) гена PR проводили набором фирмы ООО НПФ Литех и НПО Сятол (Москва). Детекцию и амплификацию изученных локусов проводили с помощью термоциклеров GeneAmp PCR-system 2720 (Applied Biosystems, США) и CG1-96 («Corbett Research» QUAGEN Германия) методом аллель специфической ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («СибЭнзим», Новосибирск). Специфичность амплификации и количество полученного амплификата разделяли и проверяли методом горизонтального электрофореза интерпретировали с использованием УФ-трансиллюминатора с встроенной фотокамерой.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета прикладных программ «OpenEpi 2009, Version 2.3». Оценка отклонения распределений генотипов изученных локусов ДНК (rs1800629I TNF-а в позициях G-308A гена, Arg72Pro гена TP53, а также G/A (rs2228480) гена ER и G/T (rs1042838) гена PR) от канонического распределения Харди-Вайнберга (PXB) проводилась с помощью программы «GenePop». Прогностическая ценность каждого генетического маркера определялась с помощью программы (<http://vigg.ru/fileadmin/user-upload/Rubanovich/>). Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR) и риска развития relative risk (RR), связи признаков рассчитывался коэффициент корреляции Спирмена (r).

Диагноз метаболического синдрома (МС) устанавливали на основании результатов антропометрии, и биохимического исследования по критериям NCEP-АТР III, АНА, (2013): определением общего холестерина, холестерин липопротеинов низкой, очень низкой и высокой плотности, триглицеридов энзиматическим ферментативным способом на анализаторе фирмы «Hoffman-La-Roche» (Австрия) с использованием реактивов фирмы Human (Германия) с вычислением коэффициента атерогенности; определением уровня глюкозы с проведением глюкозотолерантного теста на биохимическом полуавтоматическом анализаторе-фотометре 5010V5+ (Германия).

Выявлен высокий риск развития ГПЭ у женщин с метаболическими нарушениями в пери- и постменопаузе: при ожирении (OR=3,3), СД 2 типа (OR=3,6), ГБ (OR=1,3), а также: акушерскими кровотечениями в анамнезе (OR=17,3), эндометриозом (OR=31,1), миомой матки (OR=3,2), воспалительные заболевания малого таза (OR=5,2), бесплодием (OR=3,5), привычными и самопроизвольными потерями беременности (OR=1,9), а также хроническим гепатохолециститом (OR=3,0), последний способствует снижению выведения холестерина и развитию гиперхолестеремии, а также снижению выработки глобулина, связывающего половые стероиды, создавая условия циркуляции в сыворотке крови свободных фракций эстрогенов и андрогенов, усугубляет ГПЭ и МС.

Из 120 пациенток с ГПЭ 26 (21,7%) имели рецидивирующий характер АМК и из них 13 (50%) - не принимали реабилитационного курса гормональной и противовоспалительной терапии. При этом, 73,1% из них имели избыточную массу тела и гистологически подтвержденный хронический эндометрит. Наиболее частой причиной АМК в перименопаузе являлась ГПЭ (73,3%), практически у каждой третьей пациентки ГПЭ сопровождалась миомой матки (33,3%), а также эндометритом (27,5%). Аденокарцинома была выявлена у 2 пациенток, рак эндометрия - у 1й, все три пациентки имелиотягощенный семейный анамнез рака и 2 из них - сформированный МС.

Патоморфологические изменения, выявленные как в железисто-эпителиальном, так и в стромально-сосудистом компонентах характеризовались дисциркуляторными, в ряде случаев воспалительными, дизрегенераторными процессами эндометрия. В случаях развития ГПЭ на фоне ожирения сосудистые патоморфологические изменения были более выраженными и распространялись во все отделы артериальных сосудов. При этом мелкие артерии и артериолы за счёт значительного утолщения стенки были стенозированы, некоторые даже были обтурированы.

Гистохимическое исследование для выявления пролиферативной активности структурных элементов эндометрия выявило наиболее высокую концентрацию РНК в эпителии пролиферирующих желез и более выраженную неравномерность содержания гранул ДНК, как в эпителии желез, так и в стромальных клетках. Простая ГПЭ без атипии проявилась образованием кистозных полостей с неравномерно утолщенным эпителием и высоким содержанием РНК (рис.1) особенно в железах с пролиферирующим многорядным эпителием в виде красно-розового окрашивания цитоплазмы эпителия. Простая ГПЭ без атипии на фоне хронического воспаления и склероза проявилась образованием кистозно расширенных деформированных желез с высоким содержанием ДНК. Сложная ГПЭ без атипии была представлена плотно расположенными гиперплазированными железистыми, аденоматозно изме-

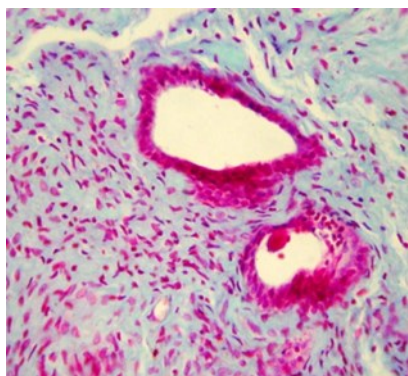


Рис. 1. Простая ГПЭ без атипии. Окраска: по Унна-Брауце. Ув: ок.10, об.40.

Высокое содержание РНК эпителия желез

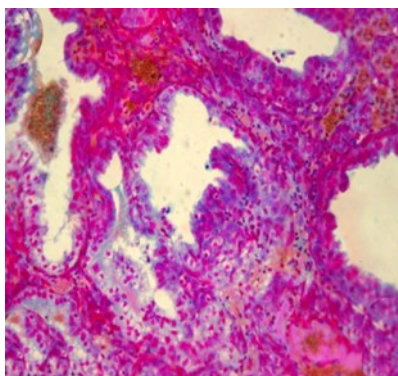


Рис. 2. Сложная ГПЭ без атипии. Окраска: по Фельгену. Ув: ок.10, об.40

Повышенное содержание ДНК в ядрах эпителия желез

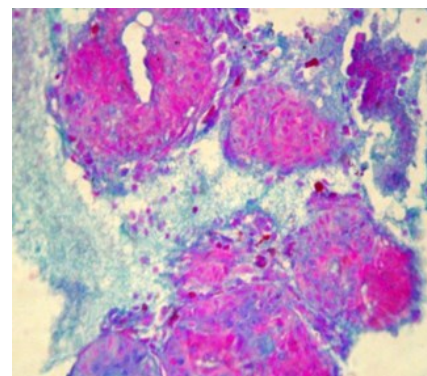


Рис. 3. Сложная ГПЭ без атипии. Окраска: по Унна-Брауце. Ув: ок.10, об.40.

Гранулы РНК в пролиферативно активных клетках желез

ненными структурами. Выраженная пролиферативная активность высокого и многорядного эпителия сопровождалась большим количеством ДНК в ядрах (рис. 2) и высоким содержанием РНК, особенно в эпителии многорядно и аконтотически пролиферирующих желез (рис. 3) и высоким содержанием ШИК-положительного вещества.

Также было выявлено, что дезорганизационные гистологические изменения в эндометрии у женщин с АМК в пери- и ранней постменопаузе сопровождаются воспалением (27,3%), развитием гиперплазии и гипертрофии в эндометрии (73,3%) и гладкомышечных клетках. Гистохимическое исследование выявило пролиферативную активность с наиболее высокой концентрацией РНК в эпителии пролиферирующих желез, а в крупных ядрах эпителия желез и в стромальных клетках - неравномерное содержание гранул ДНК, что свидетельствует о высокой митотической активности в гиперплазированной эндометрии и необходимости проведения адекватной терапии для профилактики прогрессирования данных изменений.

Исследование молекулярных механизмов ГПЭ и поиск их фармакологической коррекции — одно из самых динамично развивающихся областей современной молекулярной медицины. Ключевыми генами регуляции пролиферативной активности клеток эндометрия является ген TNF- α , а ведущим геном канцерогенеза - проапоптотический белок Trp53. Исследование генного полиморфизма эстрогенных (ER) и прогестероновых рецепторов (PR) является актуальным ввиду отсутствия данных по их роли в развитии ГПЭ и ответа на МГТ. Процессы пролиферации эндо- и миометрия на сегодняшний день рассматриваются как единый процесс роста от доброкачественного в злокачественный. Как показали исследования, в группе женщин с АМК генотип G/G полиморфизма (rs2228480/594) гена ER не является генетическими детерминантами развития ГПЭ. Кроме того, его выявление играет протекторную роль в развитии ГПЭ на фоне ожирения ($\chi^2=5,7$; $P=0,02$; $RR=0,8$; $OR=0,3$). Это лишний раз свидетельствует об эстрогензависимости ГПЭ и предопределяет его адекватный ответ на эстрогенотерапию. Метаболическая дисфункция при ожирении сопровождается хроническим воспалением и это ведет к повреждению ДНК, чем можно объяснить снижение протекторной роли полиморфизмов генов (в частности часто встречающегося генотипа G/G полиморфизма (rs2228480/594) гена ER) в развитии ГПЭ, особенно на фоне ожирения и рецидива на фоне менопаузальной гормональной терапии. Доминирование редкого гомозиготного варианта полиморфизма T/T (s1042838) гена PR у женщин с рецидивирующими АМК на фоне ожирения ($\chi^2=6,2$; $P=0,01$; $RR=8,9$; $OR=9,6$) может достоверно свидетельствовать об отсутствии ответа на традиционную прогестероновую антирецидивную терапию при АМК. Определена фенотипическая связь между наличием ожирения и ГПЭ в пери- и постменопаузе, а также подтверждена эффективность полиморфизма G/T (rs1042838) гена PR у женщин с АМК и ожирением, ($OR=2,1$; $P=0,02$) и полиморфизм данного гена можно

считать геном-кандидатом на развитие ГПЭ в пери- и постменопаузе. У женщин с АМК как с ожирением, так и без такового отмечается статистически значимое превалирование как аллеля А ($\chi^2=4,2$; $P=0,06$; $RR=1,7$; $OR=1,8$), так и генотипа G/A rs1800629 гена TNF- α ($\chi^2=4,3$; $P=0,04$; $RR=1,7$; $OR=1,9$) над группой контроля. Нами выявлена прогностическая эффективность маркера полиморфизма Arg72Pro в гена TP53 у женщин с АМК и ожирением ($OR=2,2$; $P<0,05$). Arg/Arg можно считать относительно надежным протектором развития АМК на фоне ожирения, а Pro/Rго - его предиктором.

Коррекция метаболических нарушений является этиопатогенетически обоснованной и должна обязательно входить в комплекс терапии больных с ГПЭ и ожирением. Кроме того, выяснение анамнеза дало предпосылки изучить генетический полиморфизм у женщин с АМК, особенно у женщин с отягощенным семейным онкоанамнезом, так как проведение лишь морфологических исследований не может составить прогноз риска прогрессирования ГПЭ до малигнизации. В связи с этим исследование полиморфизма генов провоспалительного маркера (TNF- α), маркера ангио- и неогенеза Trp-53, а также генов рецепторов половых стероидов – ER1 и PR могут дать возможность ранней доклинической диагностики и поиска оптимального лечения гиперпластических процессов конечным этапом которых может явиться злокачественный процесс. Так, у 3х женщин с отягощенным семейным и личным онкоанамнезом было выявлено гомозиготное носительство редкого «мутантного» Pro/Pro гена Trp53.

Таким образом, нами доказана патогенетическая связь между развитием, прогрессированием и рецидивами ГПЭ и маточными кровотечениями с метаболическими нарушениями у женщин в пери- и постменопаузе, а также установлена концептуальная связь ГПЭ и маточных кровотечений в перименопаузе на фоне ожирения с генетическими детерминантами - частотой распределения аллелей и генотипических вариантов генов рецепторов эстрогенов (rs2228480 ER1); прогестерона (rs1042838 PR); фактора некроза опухоли (rs1042522 rs1800629 TNF- α) и апоптоза (Arg72Pro гена TP53).

Использованная литература:

1. Габидуллина Р.И., Смирнова Г.А., Нухбала Ф.Р., Валеева Е.В., Орлова Ю.И., Шакиров А.А. Гиперпластические процессы эндометрия: современная тактика ведения пациенток // Consilium Medicum. – 2019. - №6. –С. 53-58.
2. Давыдов А.И., Новрузова Н.Х., Стрижаков А.Н. Гиперплазии эндометрия: анализ классификации ВОЗ 2014 и протокола RCOG & BSGE с позиций собственных результатов // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2018. -№ 17(4). - С. 11–24. DOI: 10.20953/1726-1678-2018-4-11-24.
3. Мирзахмедова Н.А. Клинико-генетические параметры метаболического синдрома у женщин с хирургической и физиологической менопаузой // Медицинские новости. - Минск, 2019. - №4. – С. 82-84.
4. Ордянец И.М., Аракелов С.Э., Павлова Е.А., Дмитриева Е.В. и соавт. Генетический риск развития гиперпластического процесса в эндометрии и в молочных железах, ассоциированный полиморфизмом генов-кандидатов // Мать и дитя в Кузбассе. - 2014. - №4 (59). - 2014. - С. 62–65.
5. Подзолкова Н.М., Подзолков А.В., Брагина А.Е., Роговская С.И. Современные возможности диагностики, лечения и профилактики возрастзависимых заболеваний у женщин. М: ГЭОТАР-Медиа, 2019 – 200 с.
6. Слюсарева О.А. Молекулярные методы диагностики гиперплазии эндометрия // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2016. - № 2. – С. 176-181
7. Станоевич И.В., Кудрина Е.А., Жолобова М.Н., Масякина А.В., Ковалева А.М. Ожирение и обменные нарушения как фактор риска гиперплазии эндометрия, миомы матки и аденомиоза // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2016. - №3(3). – С. 149-155. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2016-3-3-149-155>.
8. Ткаченко Л.В., Свиридова Н.И. Гиперпластические процессы эндометрия в пременопаузе: современные возможности гормональной коррекции и профилактики // Гинекология. – 2013. №15 (2). – С. 8–12.
9. Чернуха Г.Е., Ильина Л.М., Иванов И.А. Аномальные маточные кровотечения: ставим диагноз и выбираем лечение // Гинекология. - 2018. - № 20 (4). - С. 4-8. DOI: 10.26442/2079-5696_2018.4.4-8.

10. А. С. Юлдашева, Г. М. Ахмаджонова Проблемы ациклического маточного кровотечения в период перименопаузы // Вестник врача, № 1 (93), 2020. С.106-108. DOI: 10.38095/2181-466X-2020931-106-108
11. Anagnostis P., Bitzer J., Cano A. et al. Menopause symptom management in women with dyslipidemias: an EMAS clinical guide // *Maturitas*. – 2020. - May 135. – P. 82-88. doi:10.1016/j.maturitas.2020.03.007.
12. Dotlic J., Nicevic S., Kurtagis I. et al. Hormonal Therapy in Menopausal Transition: Implications for Improvement of Health-Related Quality of Life // *Gynecol Endocrinol.* - 2020. - №36 (4). – P. 327–332. doi:10.1080/09513590.2019.1676409.
13. Gallos I.D., Alazzam M., Clark T., Faraj R., Rosenthal A., Smith P., et al. RCOG Greentop Guideline: Management of Endometrial Hyperplasia. 2016. Available at:https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/green-top_guidelines/gtg_67_endometrial_hyperplasia.pdf.
14. Gon S., Kundu T., Mallick D. et al. A study on histopathological patterns of endometrium in different types of abnormal uterine bleeding among peri and postmenopausal women // *J. Dent. Med. Sci. (IOSR-JDMS)*. – 2016. №15. - Issue 9. – P. 106–111.
15. Özdemir S., Batmaz G., Ates S. et al. Relation of metabolic syndrome with endometrial pathologies in patients with abnormal uterine bleeding // *Gynecol. Endocrinol.* – 2015. - №31 (9) – P. 725-729. doi: 10.3109/09513590.2015.1058355.
16. National Collaborating Centre for Women’s and Children’s Health; National Institute for Health and Clinical Excellence. NICE guideline [NG88]. Heavy menstrual bleeding: assessment and management. March 2018.
17. Santoro N., Crawford S.L., El Khoudary S.R., Allshouse A.A., Burnett-Bowie S.A., Finkelstein J., et al. Menstrual Cycle Hormone Changes in Women Traversing Menopause: Study of Women's Health Across the Nation // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2017, Jul 1. – Vol. 102 (7). – P. 2218-2229. DOI: 10.1210/jc.2016-4017.
18. Solomatina A., Martirosyan K., Tikhonov D. Influence of the receptor gene expression of the reproductive hormones at patients with endometrium pathology in postmenopause // *XX FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics*. - Rome, 2012. Wouk N., Helton M. Abnormal Uterine Bleeding in Premenopausal Women // *Am. Fam. Physician.* – 2019. Apr. 1 – Vol. 99 (7). – P.435-443. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30932448>