Оригинальная статья

Роль молекулярно-генетических факторов в формировании рубца матки после кесарева сечения

Н. Е. Кан, В. Л. Тютюнник, Н. А. Ломова, А. Е. Донников, Н. В. Долгушина

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, г. Москва

Цель исследования: определить молекулярно-генетические факторы, ассоциированные с формированием неполноценного рубца на матке после кесарева сечения (КС).
Дизайн: одномоментное поперечное исследование типа «случай — контроль».
Материалы и методы. По результатам морфологического исследования в исследование вошли 160 женщин. Группу 1 (основную) составили 80 пациенток с неполноценным (НР), группу 2 (контроля) — 80 с полноценным рубцом (ПР) на матке после КС. В работе были использованы иммуногистохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.
Результаты. У пациенток обеих групп проводили интраоперационную оценку области рубца визуально во время повторного КС. ПР, как правило, не визуализировались или имели вид соединительнотканного рубца толщиной 3–5 мм. НР были представлены в виде локального или тотального истончения миометрия менее 2 мм. В результате иммуногистохимического исследования была установлена высокая экспрессия коллагена III типа в рубцовой ткани. При НР имелась тенденция к снижению содержания коллагена IV типа. В результате молекулярно-генетического исследования выявлена статистически значимая неравновесность сцепления между полиморфизмами гена эстрогенового рецептора (ESR) α -397 T>C (Pvull) [rs2234693] и -351 G>A (Xbal) [rs9340799]: D′ = 0,991 (0,95–1,00), LOD = 16,98. Наиболее часто встречались гаплотипы TA (52,0%) и CG (33,1%). Частота встречаемости гаплотипа CA была существенно выше у женщин с признаками воспаления в ткани рубца: 17,2% против 5,4% (p = 0,046).
Заключение. Полиморфизмы гена ESR-α играют роль в дезорганизации соединительной ткани либо напрямую, управляя процессами ее ремоделирования, либо через регуляцию процессов воспаления и репарации. Для развития неполной репарации ткани после КС прежде всего имеют значение дисгормональный и ишемический факторы, что может быть связано с полиморфизмом генов ESR.
Ключевые слова: кесарево сечение, рубец матки, коллаген, полиморфизмы гена эстрогенового рецептора α.

Original Paper

The Role of Molecular Genetic Factors in the Development of Uterine Scarring after Cesarean Section

N. Ye. Kan, V. L. Tyutyunnik, N. A. Lomova, A. Ye. Donnikov, N. V. Dolgushina

V. I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Study Objective: To identify molecular genetic factors associated with formation of an insecure uterine scar after cesarean section (CS).
Study Design: This was a one-stage, cross-sectional, case-control study.
Materials and Methods: Based on the results of morphological examination, 160 women were included in the study. Group 1 (main group) included 80 patients with insecure post-cesarean section scars (IS); Group 2 (control group) was made up of 80 patients with secure post-cesarean section scars (SS). Study methods included immunohistochemistry, molecular genetic techniques, and statistical analysis.
Study Results: In both groups, an intraoperative visual assessment of the scar area was performed during a repeat CS. Secure scars were not usually observed, or appeared as connective-tissue scars 3-5 mm wide. Insecure scars appeared as local or total thinning of the myometrium to less than 2 mm. Immunohistochemistry showed high expression of type III collagen in the scar tissue. Women with IS showed a trend towards lower levels of type IV collagen. Molecular genetic analysis showed statistically significant linkage disequilibrium between estrogen receptor (ESR) α gene polymorphisms -397 T>C (Pvull) [rs2234693] and -351 G>A (Xbal) [rs9340799]: D′ = 0.991 (0.95–1.00), LOD = 16.98. The most commonly identified haplotypes were TA (52.0%) and CG (33.1%). The CA haplotype was detected significantly more frequently in women with signs of inflammation in the scar tissue: 17.2% vs. 5.4% (p = 0.046).
Conclusion: ESR-α gene polymorphisms contribute to the disorganization of connective tissue either directly, by influencing its remodeling, or by regulating inflammation and repair. Hormone imbalance and ischemia play a key role in incomplete tissue repair after CS, which could be related to polymorphisms in ESR genes.
Keywords: cesarean section, uterine scar, collagen, estrogen receptor α gene polymorphisms.

Отсутствие объективных диагностических критериев оценки состояния рубца на матке во время беременности послужило основой для проведения данного исследования. Были выделены морфологические предикторы формирования несостоятельности рубца. Молекулярно-генетическое исследование обосновало возможность использования результатов генотипирования полиморфизмов гена эстрогенового рецептора (ESR) α в качестве прогностического критерия формирования несостоятельности рубца матки.

В последние годы отмечается значительный рост частоты абдоминального родоразрешения, обусловленный расширением показаний к операции, среди которых приоритетны относительные — в интересах плода. Частота кесарева сечения (КС) в России в среднем составляет 27%, достигая

Долгушина Наталия Витальевна — д. м. н., доцент, заведующая отделом научно-организационного обеспечения ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: n_dolgushina@oparina4.ru
Донников Андрей Евгеньевич — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: a_donnikov@oparina4.ru
Кан Наталья Енкыновна — д. м. н., заведующая акушерским отделением ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: kan-med@mail.ru
Ломова Наталья Анатольевна — научный сотрудник акушерского отделения ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: n_lomova@oparina4.ru
Тютюнник Виктор Леонидович — д. м. н., заведующий первым акушерским физиологическим отделением ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: tioutiounnik@mail.ru

30–40% в перинатальных центрах, и не имеет в настоящее время тенденции к снижению [1, 2].

На сегодняшний день у 4–8% беременных рубец на матке, а каждое третье КС является повторным [2, 3]. Более половины женщин с рубцом на матке после абдоминального родоразрешения планируют в будущем иметь детей, что ставит перед медицинской общественностью задачу поиска путей диагностики состояния рубца матки у таких пациенток.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что беременность у женщин с оперированной маткой сопряжена с высоким риском осложнений как у матери, так и у плода [4–6].

Ввиду роста частоты КС и его осложнений важным становится поиск прогностических критериев полноценности рубца на матке, определяющих течение беременности и родов. Однако принятые в настоящее время методы оценки полноценности рубца недостаточно информативны и нередко являются инвазивными, что ограничивает их применение во время беременности. В последние годы все большее значение в развитии патологических процессов придают генетическим факторам, в связи с чем поиск молекулярно-генетических предикторов формирования полноценности рубца весьма актуален.

Особенности репарации тканей матки определяют формирование состоятельности рубца после КС. На течение репарации в матке влияет множество факторов, например анемия, преэклампсия, воспалительные процессы, иммунный статус, техника оперативного вмешательства и используемый шовный материал, длительность операции и кровопотеря, течение послеоперационного периода, а также время до наступления следующей беременности [7–9]. Ряд осложнений (внутриматочные вмешательства, воспалительные заболевания гениталий, интра- и послеоперационные осложнения) в 1,5 раза повышают риск формирования несостоятельности рубца [10, 11]. Многие исследователи установили, что формирование морфофункциональной полноценности миометрия при КС поперечным разрезом в нижнем сегменте матки происходит в течение 1–2 лет после операции [8–12].

В последние годы особое внимание уделяется изучению генетических маркеров предрасположенности к различным заболеваниям. Кроме того, на современном этапе происходит постепенный переход от одиночных маркеров к многофакторным моделям и анализу гаплотипов [13]. Построение клинико-молекулярных моделей репаративных возможностей ткани матки после КС находится на сегодняшний день в фокусе внимания исследователей.

Цель исследования: определить молекулярно-генетические факторы, ассоциированные с формированием неполноценного рубца на матке после КС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на базе акушерского отделения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России в 2015–2016 гг. Дизайн — одномоментное поперечное исследование типа «случай — контроль». Методом подбора пар из 379 женщин с рубцом на матке были отобраны 160 пациенток по результатам морфологического исследования биоптата миометрия в области предыдущего рубца. Группу 1 (основную) составили 80 женщин с неполноценным (НР), группу 2 (контроля) — 80 с полноценным рубцом (ПР) на матке после КС.

Иммуногистохимические реакции проводились на серийных парафиновых срезах толщиной 4–5 мкм, расположенных на стеклах, покрытых APES-слоем (A. Janice, 1983). Срезы обрабатывались с помощью стандартного микроволнового метода иммуногистохимии. В качестве первичных антител использовались моноклональные антитела к коллагену III и IV типов (Lab Vision, ready-to-use) и ESR α и β (Lab Vision, 1:100). Для иммуногистохимических реакций ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре иммуногистохимии, но без добавления первичных антител.

Выделение ДНК проводили по методу Higuchi (1989) с некоторыми модификациями. Полученные образцы ДНК до типирования хранили при температуре –20 °С. Концентрация ДНК, измеренная на ДНК-минифлуориметре (Hoefer, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

В ходе генотипирования использовали один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида, несущих различные флуорофоры. Определение генотипа проводили путем анализа кривых плавления с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

ДНК для генотипирования выделяли из цельной крови с помощью системы выделения «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Определение замен одиночных нуклеотидов проводили модифицированным методом «примыкающих проб» (adjacent probes, kissing probes), используя оригинальные олигонуклеотиды (И. А. Кофиади, Д. В. Ребриков, 2006).

Для оценки распространенности исследуемых генных полиморфизмов в популяции применяли образцы периферической крови 102 здоровых женщин (доноров первичной сдачи крови, идентифицирующих себя как русских).

Статистическая обработка полученных результатов проведена на персональном компьютере при помощи программного пакета SPSS Statistics 17.0 for Windows. Неравновесность сцепления анализировали с помощью свободно распространяемого продукта Haploview версии 4.2. Подготовка данных для анализа осуществлялась с использованием SNP_tools версии 1.61 — свободно распространяемого расширения для MS Excel.

Непосредственная оценка эффективности классификации и качества модели была получена путем расчета численного показателя площади под ROC-кривой с помощью метода трапеций.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования были получены данные об анамнезе, особенностях течения беременности, родов, послеродового периода, состояния плодов и новорожденных в двух сравниваемых группах. Для разделения на группы было проведено морфологическое исследование биоптата миометрия, взятого во время КС.

Возраст беременных колебался от 22 до 45 лет и составил в среднем 32,9 ± 1,2 года в группе 1 и 33,9 ± 0,9 года в группе 2. Все пациентки были родоразрешены путем КС. При этом частота экстренного КС была выше в основной группе (65,0%), также только у участниц этой группы имели место преждевременные роды (3,8%). Следует отметить, что основными показаниями к родоразрешению стали начало родовой деятельности (31,3% и 23,7%), подозрение

на несостоятельность рубца на матке (25,0% и 5,0%) и преждевременное излитие околоплодных вод (8,8% и 10,0%).

Особый интерес представляло изучение характера репаративных процессов в миометрии после КС. У пациенток обеих групп проводили интраоперационную оценку области рубца визуально во время повторного КС. ПР, как правило, не визуализировались или имели вид соединительнотканного рубца толщиной 3–5 мм. НР были представлены в виде локального или тотального истончения миометрия менее 2 мм. Интраоперационно в группе 2 ПР был констатирован у 87,4%, а у 12,6% отмечался НР в виде локального истончения. В группе 1 у 84,2% участниц выявили НР в виде локального или тотального истончения вплоть до пролабирования плодного пузыря, у 15,8% женщин группы установлен ПР.

По результатам морфометрического исследования толщина ПР колебалась от 3 мм до 5 мм, в то время как толщина подавляющего большинства НР не превышала 2 мм, а в ряде случаев рубцовая ткань подвергалась атрофии и истончению с образованием тонкой пленки (висцеральной брюшины), прикрывающей дефект в стенке матки.

Для оценки процессов репарации было проведено морфологическое исследование биоптатов рубцов. При микроскопическом исследовании ПР был представлен двумя морфологическими вариантами: первый характеризовался присутствием в зоне предполагаемого рубца пучков гладкомышечных клеток, разделенных тонкими фиброзными септами с отдельными микрососудами с утолщенными стенками. Вероятно, восстановление ткани миометрия в таких случаях происходит по механизму реституции (полной репарации). Второй вариант ПР — фиброзно-мышечный рубец из молодой соединительной ткани, богатой разнообразными фибробластическими элементами с лимфо-макрофагальной инфильтрацией, полнокровными капиллярами и сосудами мелкого калибра со склерозированными стенками. Рубцовая ткань в виде септ распространялась в прилежащую гладкомышечную ткань, в которой обнаруживались признаки регенерационной гипертрофии и слабо выраженных дистрофических изменений лейомиоцитов.

В результате морфологического исследования были отобраны образцы тканей для иммуногистохимических реакций, которые установили преобладание коллагена III типа в рубцовой ткани. Как известно, коллаген III типа является коллагеном эмбриональных тканей, облегчающим перестройку и созревание грануляционной ткани, сменяющимся впоследствии на коллаген I типа. Нами не было выявлено различий между группами в накоплении коллагена III типа, однако обнаружена его высокая экспрессия в рубцовой ткани. Превалирование коллагена III типа в НР свидетельствовало о нарушении процессов репарации. Кроме того, при НР имелась тенденция к снижению содержания коллагена IV типа, который характеризуется отсутствием периодичных фибрилл, что обусловливает его роль в регулируемой проницаемости мембран. Полученные в результате иммуногистохимического исследования данные косвенно указывают на нарушение механизмов репарации у обследованных женщин.

Особый интерес представляло изучение содержания ESR-α (внутриклеточных). Данные литературы об их связи с процессами воспаления и репарации немногочисленны и противоречивы. Известно, что в репродуктивном возрасте эстрогены обладают противовоспалительным и вазопротекторным эффектом [14, 15]. Установлено, что в отсутствие эстрогенов активация макрофагов в процессе заживления раны стимулирует воспалительную реакцию с развитием репарации ткани, ангиогенеза и ремоделирования [16].

При иммуногистохимическом исследовании ESR-α обнаруживали в цитоплазме гладкомышечных клеток, а в фиброзно-мышечной ткани рубцов они в большинстве случаев не определялись. По-видимому, данная особенность связана с понижением экспрессии ESR-α на последних сроках беременности в связи с ингибированием их высоким содержанием прогестерона. Принимая во внимание результаты иммуногистохимического исследования, представляется важным проведение молекулярно-генетических исследований для определения генетической предрасположенности к дезорганизации соединительной ткани и, как следствие, формированию неполноценности рубца.

Часто́ты распределения генотипов в обеих группах соответствовали соотношению Харди — Вайнберга. Нами не было выявлено статистически значимой ассоциации между признаками воспаления и распределением генотипов исследованных полиморфизмов гена ESR-α.

Необходимо отметить, что исследованные полиморфизмы гена ESR-α расположены очень близко друг к другу и характеризуются выраженной неравновесностью сцепления, в связи с чем авторы провели ее анализ. Наиболее значимой была неравновесность сцепления между полиморфизмами -397 T>C (Pvull) [rs2234693] и -351 G>A (Xbal)[rs9340799]: D′ = 0,991 (0,95–1,00), LOD = 16,98. Чаще всего встречались гаплотипы TA (52,0%) и CG (33,1%). Для этих гаплотипов не было обнаружено статистически значимой ассоциации с признаками дезорганизации соединительной ткани в рубце. Частота встречаемости гаплотипа CA была существенно выше у женщин с признаками воспаления в ткани рубца: 17,2% против 5,4% (p = 0,046). Среди пациенток, у которых доля фиброзной ткани в рубце превышала 10,0%, также наблюдалась тенденция к увеличению частоты этого гаплотипа (14,9% против 8,3%), но различия не были статистически значимыми.

Для уточнения клинической значимости выявления данного гаплотипа нами была оценена его распространенность в популяции и у женщин, имеющих рубец на матке, а также у женщин с самопроизвольными родами. Было обнаружено, что в целом в популяции распространенность гаплотипа CA достаточно высока и практически не отличается от таковой у пациенток с НР (20,1% и 17,2% соответственно). В то же время среди женщин, имеющих рубец на матке и успешные самопроизвольные роды, доля исследуемого гаплотипа составила всего 2,2%, что соответствовало 5,4% среди пациенток с ПР в проведенном нами исследовании.

Значимых различий в частоте выявления полиморфизмов гена ESR-β (-12214 G>T [rs 1271572]) не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что полиморфизмы гена эстрогенового рецептора (ESR) α играют роль в дезорганизации соединительной ткани либо напрямую, управляя процессами ее ремоделирования, либо через регуляцию процессов воспаления и репарации. Механизмы дезорганизации соединительной ткани, судя по данным литературы, могут быть связаны с иммунопатологическими процессами, ишемическим фактором, а также с гормональной дисрегуляцией на почве генетически детерминированной дефектности ESR. По всей вероятности, для дезорганизации соединительной ткани матки, а также развития

неполной репарации ткани после кесарева сечения прежде всего имеют значение дисгормональный и ишемический факторы, что может быть связано в том числе с полиморфизмом генов ESR.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Савельева Г. М., Караганова Е. Я., Курцер М. А., Кутакова Ю. Ю., Панина О. Б., Трофимова О. А. Кесарево сечение в современном акушерстве. Акушерство и гинекология. 2007; 2: 3–8. [Savel'eva G. M., Karaganova E. Ya., Kurtser M. A., Kutakova Yu. Yu., Panina O. B., Trofimova O. A. Kesarevo sechenie v sovremennom akusherstve. Akusherstvo i ginekologiya. 2007; 2: 3–8. (in Russian)]*
2. *Краснопольский В. И., Логутова Л. С., Буянова С. Н. Репродуктивные проблемы оперированной матки. М.: Миклош; 2005. 159 с. [Krasnopol'skii V. I., Logutova L. S., Buyanova S. N. Reproduktivnye problemy operirovannoi matki. M.: Miklosh; 2005. 159 s. (in Russian)]*
3. *Smith D., Stringer E., Vladutiu C. J., Zink A. H., Strauss R. Risk of uterine rupture among women attempting vaginal birth after cesarean with an unknown uterine scar. Am. J. Obstet. Gynecol. 2015; 213(1): 80.e1–5.*
4. *Klemetti R., Gissler M., Sainio S., Hemminki E. At what age does the risk for adverse maternal and infant outcomes increase? Nationwide register-based study on first births in Finland in 2005–2014. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2016; 95(12): 1368–75.*
5. *Maher M. A., Abdelaziz A. Comparison between two management protocols for postpartum hemorrhage during cesarean section in placenta previa: Balloon protocol versus non-balloon protocol. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2017; 43(3): 447–55.*
6. *Wu S. W., Lu Y. Z., Wang S. S., Dong X. J., Fang J. H., He D. et al. Analysis of factors affecting vaginal birth after cesarean. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2016; 51(8): 576–80.*
7. *Sanlorenzo O., Farina A., Pula G., Zanello M., Pedrazzi A., Martina T. et al. Sonographic evaluation of the lower uterine segment thickness in women with a single previous Cesarean section. Minerva Ginecol. 2013; 65(5): 551–5.*
8. *Tsuji S., Murakami T., Kimura F., Tanimura S., Kudo M., Shozu M. et al. Management of secondary infertility following cesarean section: Report from the Subcommittee of the Reproductive Endocrinology Committee of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2015; 41(9): 1305–12.*
9. *Dosedla E., Calda P. Can the final sonographic assessment of the cesarean section scar be predicted 6 weeks after the operation? Taiwan J. Obstet. Gynecol. 2016; 55(5): 718–20.*
10. *Bolten K., Fischer T., Bender Y. Y., Diederichs G., Thomas A. Pilot Study of MRI/US fusion in the assessment of the cesarean section scar in the postpartum period. Ultrasound Obstet. Gynecol; 2016. DOI: 10.1002/uog.17349*
11. *Мамытбекова З. М. Оценка состояния рубца на матке в первые три месяца после кесарева сечения. Медицинские аспекты здоровья женщины. 2010; 3: 57–9. [Mamytbekova Z. M. Otsenka sostoyaniya rubtsa na matke v pervye tri mesyatsa posle kesareva cecheniya. Meditsinskie aspekty zdorov'ya zhenshchiny. 2010; 3: 57–9. (in Russian)]*
12. *Пекарев О. Г., Майбородин И. В., Поздняков И. М., Моторина Ю. П., Альхимович В. А. Прогноз и перспективы самопроизвольного родоразрешения у женщин с рубцом на матке после кесарева сечения. Акушерство и гинекология. 2007; 3: 33–7. [Pekarev O. G., Maiborodin I. V., Pozdnyakov I. M., Motorina Yu. P., Al'khimovich V. A. Prognoz i perspektivy samoproizvol'nogo rodorazresheniya u zhenshchin s rubtsom na matke posle kesareva secheniya. Akusherstvo i ginekologiya. 2007; 3: 33–7. (in Russian)]*
13. *Banyasz I., Bokodi G., Vasarhelyi B., Treszl A., Derzbach L., Szabo A. et al. Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications. Eur. Cytokine Netw. 2006; 17(4): 266–70.*
14. *Piskunova E. V. Clinical significance of office hysteroscopy in examination algorithm of partly faulty uterus scar after cesarean section on the stage of pregnancy planning. J. Minim. Invasive Gynecol. 2015; 22(6 suppl.): S190.*
15. *Cauwe B., Van den Steen P. E., Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2007; 42(3): 113–85.*
16. *Chen H. Y., Wan L., Chung Y. W., Chen W. C., Tsai F. J., Tsai C. H. Estrogen receptor beta gene haplotype is associated with pelvic organ prolapse. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2008; 138(1): 105–9.*

Библиографическая ссылка:
Кан Н. Е., Тютюнник В. Л., Ломова Н. А., Донников А. Е., Долгушина Н. В. Роль молекулярно-генетических факторов в формировании рубца матки после кесарева сечения // Доктор.Ру. 2017. № 3 (132). С. 16–19.

Citation format for this article:
Kan N. Ye., Tyutyunnik V. L., Lomova N. A., Donnikov A. Ye., Dolgushina N. V. The Role of Molecular Genetic Factors in the Development of Uterine Scarring after Cesarean Section. Doctor.Ru. 2017; 3(132): 16–19.