РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 704 819**(13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/53 (2019.08)

(21)(22) Заявка: **2019121396, 09.07.2019**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.07.2019

Дата регистрации:
31.10.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **09.07.2019**

(45) Опубликовано: **31.10.2019** Бюл. № **31**

Адрес для переписки:
153045, г. Иваново, ул. Победы, 20, ФГБУ "Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова", отдел патентоведения и научной информации

(72) Автор(ы):
Воскресенская Дарья Леонидовна (RU),
Воронин Дмитрий Николаевич (RU),
Анциферова Юлия Станиславовна (RU),
Сотникова Наталья Юрьевна (RU),
Малышкина Анна Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное учреждение "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2236684 C2, 20.09.2004. RU 2340897 C1, 10.12.2008. KR 2017068157 A, 19.06.2017. КРАСИЛЬНИКОВА А.К. и др. Особенности функционального состояния фагоцитов крови у пациенток с эндометриозом I-II стадии и бесплодием // Российский вестник акушера-гинеколога, 2017, N3, с.9-14.**

(54) Способ прогнозирования увеличения размеров лейомиомы матки

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гинекологии, и может быть использовано в качестве прогнозирования увеличения размеров лейомиомы матки у женщин репродуктивного возраста в течение одного года наблюдения. Сущность способа заключается в том, что в первую фазу менструального цикла в мононуклеарных клетках эндометрия, расположенного в проекции миоматозного узла, определяют относительное содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте. При значении этого показателя менее 20% прогнозируют увеличение размеров лейомиомы матки в течение одного года, а при значении более 20% прогнозируют стабильный размер лейомиомы матки в течение одного года. Использование данного способа позволяет прогнозировать риск увеличения размеров лейомиомы матки, что дает возможность максимально сохранить репродуктивную функцию женщин за счет оптимизации выбора и объема консервативного и оперативного методов лечения. 1 табл., 2 пр.

RU 2704819 C1

RU 2704819 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 704 819**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G01N 33/53 (2019.08)

(21)(22) Application: **2019121396, 09.07.2019**

(24) Effective date for property rights:
09.07.2019

Registration date:
31.10.2019

Priority:
(22) Date of filing: **09.07.2019**

(45) Date of publication: **31.10.2019** Bull. № **31**

Mail address:
153045, g. Ivanovo, ul. Pobedy, 20, FGBU "Ivanovskij NII materinstva i detstva im. V.N. Gorodkova", otdel patentovedeniya i nauchnoj informatsii

(72) Inventor(s):
Voskresenskaya Darya Leonidovna (RU),
Voronin Dmitrij Nikolaevich (RU),
Antsiferova Yuliya Stanislavovna (RU),
Sotnikova Natalya Yurevna (RU),
Malyshkina Anna Ivanovna (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Ivanovskij nauchno-issledovatelskij institut materinstva i detstva imeni V.N. Gorodkova" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) METHOD FOR PREDICTING UTERINE LEIOMYOMA SIZE INCREASE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to gynecology, and can be used as a prediction of increasing uterine leiomyoma size in females of reproductive age within one year of observation. Substance of the method consists in that in the first phase of menstrual cycle in mononuclear cells of endometrium, located in projection of myomatous nodule, relative content of CD204+ macrophages in macrophage gate is determined. If the value is less than 20 %, the uterine leiomyoma size is predicted to increase within one year, and if the value is more than 20 %, the stable size of the uterine leiomyoma is predicted within one year.

EFFECT: using the given method enables predicting a risk of increasing uterine leiomyoma size, which enables to maximally preserve the reproductive function of women by optimizing the choice and volume of conservative and surgical methods of treatment.

1 cl, 1 tbl, 2 ex

RU 2704819 C1

RU 2704819 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к гинекологии, и может быть использовано в качестве прогнозирования увеличения размеров лейомиомы матки у женщин репродуктивного возраста в течение одного года наблюдения.

Актуальность предлагаемого способа определяется тем, что лейомиома матки входит в число самых распространенных гинекологических заболеваний, занимая 2-е место в структуре гинекологической патологии после воспалительных заболеваний органов малого таза. Частота встречаемости, по данным разных авторов, колеблется от 15% до 45%.

В последнее время отмечается тенденция к «омоложению» данной опухоли, возникновению ее у пациенток до 30 лет, а также у женщин с нереализованной репродуктивной функцией [Рецидивы миомы матки. Современный взгляд на проблемы диагностики, лечения и прогнозирования / Н.М. Тоноян и др. // Акушерство и гинекология. - 2019. - №3. - С. 32-38].

Наличие у пациентки лейомиомы матки подтверждается результатами инструментального исследования, такими как УЗИ, МРТ. Увеличение размеров лейомиомы матки в динамике оценивается при помощи этих методов с интервалом один раз в год.

В связи с этим встает вопрос о необходимости оценки прогноза увеличения размеров лейомиомы матки при первой постановке диагноза, что в дальнейшем позволяет адекватно выбрать необходимую тактику ведения и наблюдения за женщиной.

Известно, что женщин с быстрорастущей миомой матки относят к группе риска на развитие гиперпластических процессов эндометрия и рака эндометрия, а также первично-множественных опухолей гормонозависимых органов [Миома матки / под ред. И.С. Сидоровой. - М.: МИА, 2003. - 256 с.]. Быстрый рост опухоли приводит к возникновению симптомокомплекса, связанного с нарушением менструальной (гиперполименорея, приводящая к анемии) и репродуктивной функций (бесплодие, невынашивание беременности), сдавлением соседних органов и нарушению их функции, появлению хронических тазовых болей, как следствие ухудшению качества жизни женщины [Иммунные механизмы быстрого роста миомы матки / А.И. Малышкина, Н.Ю. Сотникова, Ю.С. Анциферова, А.К. Красильникова. - Иваново, 2010. - 272 с.].

Быстрый рост и симптомная лейомиома матки являются показанием к оперативному лечению. Зачастую пациенткам проводят оперативное вмешательство в объеме гистерэктомии, что, конечно же, связано с утратой детородной функции и возможным развитием послеоперационных осложнений. В таких случаях врачу важно оценить прогноз темпа роста опухоли, поскольку интенсификация и оптимизация догоспитальной диагностики во многом определяет выбор правильной тактики ведения женщины [Инновационный подход к диагностике быстрорастущей миомы матки / Ю.Ю. Уханова, Л.В. Дикарева, Е.Г. Шварев, А.К. Аюпова // Астраханский медицинский журнал. - 2015. - №3. - С. 106-114].

Врач, выявив лейомиому матки на ранней стадии развития, получает возможность своевременного выбора адекватной тактики лечения женщины. Для успешного органосохраняющего лечения лейомиомы матки необходимо разрабатывать малоинзазивные лабораторные способы, позволяющие еще на ранней стадии выявления заболевания выбрать правильную тактику ведения женщины, направленную на предотвращение прогрессирования опухолевого роста, а также с учетом ее репродуктивных планов.

Известен способ прогнозирования роста лейомиомы матки. Для выполнения этой цели авторы предлагают определять в периферической венозной крови относительное

содержание CD38+ лимфоцитов и при их значениях, равных или больших 23%, прогнозируют быстрый рост миомы матки в течение года [Патент №2236684. Российская Федерация. Способ прогонозирования роста лейомиомы матки / Посисеева Л.В., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Суворкина Е.Е., Аревадзе И.Э. // Изобретения. Полезные модели. - 2004. - №26, Ч. 3. - С. 544]. Однако, иммунные показатели периферической крови не всегда соответствуют процессам, идущим на локальном уровне (например, в эндометрии).

Наиболее близким по техническому решению к заявляемому способу является способ прогнозирования роста лейомиомы матки, заключающийся в том, что в первую фазу менструального цикла в тканях миоматозных узлов, получаемых методом трансцервикальной пункционной биопсии, иммуногистохимическим методом определяют плотность и интенсивность окрашивания рецепторов к прогестерону, и при увеличении этих показателей прогнозируют рост миомы в течение года [Correlation between the growth of uterine leiomyomata and estrigen and progesterone receptors in needle biopsy speciments / T. Ichimura et al. // Fertil. Steril. - 1998. - Vol. 70. - P. 967-971].

Недостатками данного способа являются:

1) плохая воспроизводимость результатов в связи с погрешностями при приготовлении срезов, неоднородным по интенсивности окрашиванием тканей, особенностями микроскопии;

2) высокая инвазивность и травматичность, сопряженные с повреждением опухоли и возможной инициацией роста узла;

3) высокая трудоемкость;

4) методика апробирована только у пациенток с миомой матки, соответствующей размерам более 12 недель беременности;

5) авторы не указывают точность, чувствительность и специфичность способа.

Указанные недостатки предлагается устранить в заявляемом способе.

Техническим решением заявляемого способа является повышение точности до 84,2%, чувствительности до 80,0% и специфичности до 88,9%. Обеспечивается малая инвазивность и травматичность процедуры забора биоматериала, без риска повреждения опухоли и инициации ее роста, а также расширение арсенала средств раннего прогнозирования увеличения размеров лейомиомы матки у женщин репродуктивного возраста в течение одного года наблюдения.

Заявляемый технический результат достигается тем, что в первую фазу менструального цикла в эндометрии, расположенном в проекции миоматозного узла, определяют относительное содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте и при значении этого показателя менее 20% прогнозируют увеличение размеров лейомиомы матки в течение одного года наблюдения, а при значении более 20% -прогнозируют стабильный размер лейомиомы матки в течение одного года наблюдения.

Новизна заявляемого способа заключается в том, что впервые предлагается прогнозировать увеличение размеров лейомиомы матки по определению в эндометрии, расположенного в проекции миоматозного узла, CD204+ макрофагов.

Отличительной характеристикой лейомиомы матки доброкачественной опухоли миометрия - является чрезмерная продукция компонентов экстрацеллюлярного матрикса, что свидетельствует об усиленной активности тканевых фибробластов и, как следствие, усилении процессов фиброзирования. По данным ряда авторов в ткани лейомиомы в максимальном количестве экспрессируется коллаген 1 типа [Fujisawa C., Castellot J.J Jr. / Matrix production and remodeling as therapeutic targets for uterine leiomyoma // J Cell Commun Signal. - 2014. - Vol. 8, №3. - P. 179-194].

Считается, что триггером фиброза является хроническое повреждение клеток, которое сопровождается аккумуляцией активированных фибробластов, альтернативно-активированных макрофагов и костно-мозговых клеток-предшественников и ведет к массивному образованию экстрацеллюлярного матрикса, формированию рубца и повреждению органа [Kisseleva T., Brenner D.A. Mechanisms of fibrogenesis // Exp Biol Med (Maywood). - 2008. - Vol. 233. - P. 109-122].

Ранее было показано, что макрофаги, присутствующие в "опухоли, могут участвовать в продукции компонентов внеклеточного матрикса, в тканевом ремоделировании и в росте лейомиомы [Possible involvement of inflammatory reparative processes in the development of uterine fibroids / O. Protic, et al. // Cell and Tissue Research. - 2016. - Vol. 364. - P. 415-427]. М2 макрофаги обладают высоким уровнем фагоцитарной активности, способностью к продукции компонентов экстрацеллюлярного матрикса, ангиогенных и хемотаксических факторов, а также IL-10 [Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages / L. Fuentes et al. // Mediators Inflamm. - 2010. - 219583].

Возможная роль тканевых макрофагов в активации фиброза у пациенток с миомой матки до настоящего времени не изучалась.

Известно, что CD204 или рецептор-мусорщик макрофагов 1 (Macrophage scavenger receptor 1, MSR1) экспрессируется на поверхности макрофагов и дендритных клеток. SRA/CD204 является многофункциональным рецептором, который распознает большой комплекс лигандов: липополисахариды, протеогликаны, липопротеины, асбест и кремний, модифицированные белки с улучшенным гликированием и другие [Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease / J.L. Kelley et al. // Crit Rev Immunol. - 2014. - Vol. 34, №3. - P. 241-261].

Ранее было показано, что мономерный коллаген типа I через CD204 индуцирует экспрессию фосфо-Akt, смещая альвеолярные макрофаги в профибротический тип М2 [Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation / M. Stahl et al. // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, №1. - e81382]. Высокая инфильтрация CD204+ макрофагами ассоциируется с худшим исходом I стадии аденокарциномы легкого [Sun Y., Xu S. Tumor-Associated CD204-Positive Macrophage Is a Prognostic Marker in Clinical Stage I Lung Adenocarcinoma // Biomed Res Int. - 2018. - Vol. 2018. - P. 8459193]. Ma K. с соавторами показали, что дефицит SR-A1 может опосредованно усиливать прогрессирование глиомы путем стимуляции ангиогенеза [A crosstalk between class A scavenger receptor and receptor for advanced glycation end-products contributes to diabetic retinopathy / K. Ma et al. // American journal of physiology Endocrinology and metabolism. - 2014. - Vol. 307. - E1153-1165]. Инфильтрация макрофагов, зависимая от CD204, может изменять локальное микроокружение, что, в свою очередь, может влиять на пролиферацию и/или гибель клеток, формируя направленность дифференцировки pro-Mi или pro-M2. [Class Al scavenger receptor modulates glioma progression by regulating M2-like tumor-associated macrophage polarization / H. Zhang et al. // Oncotarget. - 2016. - Vol. 7, №31. - P. 50099-50116].

Способ осуществляется следующим образом.

1. Из биоптатов эндометрия, полученных в первую фазу менструального цикла с помощью пайпель-биопсии, выделяют клеточную суспензию путем механического измельчения ткани в физрастворе, фильтруют ее через стальное сито для удаления крупных неизмельченных фрагментов, дважды отмывают в фосфатно-солевом буфере и ресуспендируют в 5 мл культуральной среды RPMI 1640 (ООО "НГДТПанЭко", Россия).

2. К 5 мл полученной клеточной суспензии добавляют 2 мл Фиколл-Урографина и выделяют обогащенную популяцию мононуклеарных клеток эндометрия стандартным методом скоростного центрифугирования [Bourn A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Invest. - 1968. - Vol. 21, №97. - P. 77].

3. Выделенную суспензию мононуклеарных клеток эндометрия дважды отмывают физиологическим раствором, доводят концентрацию клеток до 1×10^6кл/мл. К 0,1 мл полученной суспензии одновременно добавляют по 5 мкл моноклональных антител анти-CD204, меченных PE (Beckman Coulter, USA). Клетки инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывают в 1 мл физраствора.

4. На проточном цитометре определяют относительное (процентное) содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте.

При значении CD204+ макрофагов менее 20% прогнозируют увеличение размеров лейомиомы матки в течение одного года, а при значении более 20% - размеры лейомиомы матки будут стабильными в течение одного года.

Отличительными признаками способа являются: установление прогностического параметра относительного содержания в мононуклеарных клетках эндометрия, расположенного в проекции миоматозного узла, CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте, при значении которого менее 20% прогнозируют увеличение размеров лейомиомы матки, а при значении более 20% - прогнозируют стабильный размер лейомиомы матки.

Сущность заявляемого способа поясняется следующими примерами:

Пример 1.

Больная Г., 38 лет, регулярно наблюдается в женской консультации в течение шести лет по поводу миомы матки малых размеров. В анамнезе 1 своевременные роды, 5 медицинских абортов и 1 внематочная беременность. Метод контрацепции - барьерный.

При влагалищном исследовании: шейка матки без дефектов слизистой, матка увеличена до 7 недель беременности. Матка плотная, подвижная, безболезненная. Придатки не пальпируются, своды свободны.

По данным УЗИ: тело матки 62×56×60 мм неоднородной структуры. По правой боковой стенке интрамурально-субсерозный узел 28×30×25 мм. Полость матки не деформирована. М-ЭХО 12 мм. Яичники: правый 36×28 мм, левый 34×22 мм, обычной структуры.

Анализ крови: гемоглобин - 113 г/л, эритроциты - 4,3 Т/л, лейкоциты - 6,8 Г/л, тромбоциты - 270 Г/л, СОЭ - 10 мм/ч.

Клинический диагноз: интрамурально-субсерозная лейомиома матки малых размеров.

Пациентке выполнена пайпель-биопсия эндометрия. При гистологическом исследовании материала - эндометрий пролиферативного типа.

По данным иммунологического исследования по заявляемому способу установлено, что в эндометрии, локализованном в проекции узла, содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте - 52,1%.

Заключение: прогнозируется стабильный размер лейомиомы матки в течение одного года.

При дальнейшем диспансерном наблюдении, через год, жалобы у пациентки отсутствуют. По результатам УЗИ: тело матки 60×56×58 мм неоднородной структуры. По правой боковой стенке интрамурально-субсерозный узел 28×30×25 мм. Полость матки не деформирована. М-ЭХО 10 мм. Яичники: правый 36×28 мм, левый 34×22 мм, обычной структуры.

Таким образом, прогноз «стабильный размер лейомиомы матки в течение одного

года» подтвердился.

Пример 2.

Больная Я., 42 лет, наблюдается в женской консультации в течение трех лет по поводу миомы матки малых размеров. В анамнезе 4 медицинских аборта, 2 своевременных родов. От беременности не предохраняется.

При влагалищном исследовании: шейка матки без дефектов слизистой, матка увеличена до 6 недель беременности. Матка плотная, подвижная, безболезненная. Придатки не пальпируются, своды свободны.

По данным УЗИ: тело матки 54×60×49 мм неоднородной структуры. По задней стенке интрамурально-субсерозный узел 18×21×24 мм. Полость матки не деформирована. М-ЭХО 11 мм. Яичники: правый 36×24 мм, левый 33×22 мм, обычной структуры.

Анализ крови: гемоглобин - 118 г/л, эритроциты - 4,5 Т/л, лейкоциты - 7,8 Г/л, тромбоциты - 264 Г/л, СОЭ -10 мм/ч.

Клинический диагноз: интрамурально-субсерозная лейомиома матки малых размеров.

Пациентке выполнена пайпель-биопсия эндометрия. При гистологическом исследовании материала - эндометрий пролиферативного типа.

По данным иммунологического исследования по заявляемому способу установлено, что в эндометрии, локализованном в проекции узла, содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте - 18,7%.

Заключение: прогнозируется увеличение размеров лейомиомы матки в течение одного года.

При дальнейшем диспансерном наблюдении, через год, появились жалобы на тянущие боли внизу живота. По результатам УЗИ: тело матки 94×78×85 мм неоднородной структуры. По задней стенке интрамурально-субсерозный узел 60×48×54 мм. Полость матки не деформирована. М-ЭХО 10 мм. Яичники: правый 36×24 мм, левый 33×22 мм, обычной структуры.

Установлен диагноз: интрамурально-субсерозная лейомиома матки. Быстрый рост. По клиническим показаниям выполнена субтотальная гистерэктомия матки без придатков.

Таким образом, прогноз «увеличение размеров лейомиомы матки в течение одного года» подтвердился.

Указанным способом обследовано 19 женщин репродуктивного возраста с лейомиомой матки. Данные исследований приведены в таблице.

Таблица

Показатель	Количество обследованных
Всего женщин	19
истинно-положительный результат	8
ложно-положительный результат	2
истинно-отрицательный результат	8
ложно-отрицательный результат	1
Итого: точность заявляемого способа - 84,2%, чувствительность - 80,0%, специфичность - 88,9%.	

Преимущества заявляемого способа:

1. Способ позволяет с высокой точностью, чувствительностью и специфичностью прогнозировать увеличение размеров лейомиомы матки при первой постановке диагноза.

2. Малая инвазивность и травматичность процедуры забора биоматериала, без риска повреждения опухоли и инициации ее роста.

3. Своевременная оценка прогноза увеличения размеров лейомиомы матки позволяет максимально сохранить репродуктивную функцию женщин за счет оптимизации выбора и объема консервативного и оперативного лечения.

4. Эндометрий, расположенный в непосредственной близости от миоматозного узла, наиболее точно отражает процессы, происходящие в опухоли.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования увеличения размеров лейомиомы матки в течение одного года наблюдения путем иммунологического исследования биологического материала женщин репродуктивного возраста в первую фазу менструального цикла, отличающийся тем, что в мононуклеарных клетках эндометрия, расположенного в проекции миоматозного узла, определяют относительное содержание CD204+ макрофагов в макрофагальном гейте и при значении этого показателя менее 20% прогнозируют увеличение размеров лейомиомы матки, а при значении более 20% прогнозируют стабильный размер лейомиомы матки.