

УДК 618.1-007.415-06:618.177]-074/-078

АЛТАНЕЦЬ О.М.¹, МЕДВЕДЕВ М.В.²

¹Міський пологовий будинок №1, м. Дніпро

²Дніпропетровська медична академія, м. Дніпро

ДІАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЕНДОМЕТРІА ПРИ БЕЗПЛІДДІ У ЖІНОК З ЛЕГКИМИ ФОРМАМИ ЕНДОМЕТРІОЗА

Незважаючи на вдосконалення діагностики, ендометріоз діагностують з великим запізненням. Особливого занепокоєння викликає субклінічний ендометріоз у жінок з безпліддям. Несвоєчасне лапароскопічне лікування у відносно безсимптомних жінок призводить до відстрочення настання вагітності, прогресування хвороби та значного зниження фертильності.

Мета дослідження - оцінити частоту верифікації діагнозу зовнішнього генітального ендометріозу при «нормальному» та «анормальному» морфотипах еутопічного ендометрію у жінок з безпліддям.

Матеріали та методи

Обстежено 64 жінки репродуктивного віку з безпліддям. Усім пацієнткам в проліферативній фазі менструального циклу виконана Ripell-біопсія ендометрію, в якій вивчалася експресія рецепторів естрогену, прогестерону, ММП-9, bcl-2 та ki-68.

Результати дослідження та їх обговорення

У статті представлено результати вивчення комплексу імуногістохімічних маркерів в зразках еутопічного ендометрію у жінок з ендометріозом асоційованим безпліддям. Визначена чутливість, специфічність, прогностична значимість позитивного та негативного результатів. Також прорахована діагностична точність запропонованого методу.

Висновки

Комплекс імуногістохімічних маркерів може бути запропонований в якості малоінвазивної маніпуляції для верифікації початкових стадій ендометріозу у жінок з безпліддям.

Ключові слова: еутопічний ендометрій, ендометріоз, безпліддя, імуногістохімічні маркери.

Ендометріоз вважається однією з найпоширеніших та загадкових хвороб серед жінок репродуктивного віку. Нажаль, частота ендометріозу не має тенденції до зниження. Прогресуючий перебіг захворювання призводить до виникнення больового синдрому, порушення менструального циклу, безпліддя, психо-емоційних розладів, та, як наслідок, зниженню якості життя пацієнток [1].

Ще в 1986 році Janser R.P. опублікував прямі клінічні достовірні дані про зв'язок ендометріозу і безпліддя. Д.В. Богуславська і D. Lebovic в 2011 році представили дані про те, що функціональні зміни ендометрію можуть призводити до порушень імплантації у жінок з ендометріозом [3]. Супутнє безпліддя у багатьох жінок з ендометріозом, ймовірно, залежить від декількох чинників, одним з яких може бути стан еутопічного ендометрія [4,5, 7,10].

На сьогоднішній день «золотим стандартом» для діагностики ендометріозу є візуальний огляд малого тазу при лапароскопії, що доповнюється гістологічним підтвердженням [8]. Доцільність гістологічного дослідження біоптату зміненої тканини полягає в тому, що без нього кожній другій жінці ставлять псевдо-позитивний діагноз ендометріозу. Однак лапароскопія – хірургічна процедура з можливим ризиком рідкісних, але серйозних ускладнень [6,9].

Незважаючи на вдосконалення діагностики, ендометріоз діагностують з великим запізненням. В середньому проміжок між появою перших клінічних симптомів і діагнозом «ендометріоз» складає 7 років (від 3,3 до 12,1). Причому чим молодше пацієнтка, тим цей проміжок довший [1, 6].

Особливого занепокоєння викликає субклінічний ендометріоз у жінок з безплід-

дям. Несвоєчасне лапароскопічне лікування у відносно безсимптомних жінок призводить до відстрочення настання вагітності, прогресування хвороби та значного зниження фертильності у разі запізнілого використання ендоскопічних методів лікування ендометріозу у жінок з неплідністю.

У зв'язку з цим нові дослідження мають бути орієнтовані на ранню діагностику ендометріозу та стати пріоритетним напрямком досліджень в цій області.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – оцінити частоту верифікації діагнозу зовнішнього генітального ендометріозу при «нормальному» та «анормальному» морфотипах еутопічного ендометрію у жінок з безпліддям.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під наглядом знаходилося 64 жінки репродуктивного віку з безпліддям. Усім пацієнткам в проліферативній фазі менструального циклу виконана Ripell-біопсія ендометрію, в якій вивчалася експресія рецепторів естрогену, прогестерону, ММП-9, bcl-2 та ki-68. Ripell-біопсія ендометрію виконувалась після отримання інформованої згоди пацієнтки, за допомогою аспіраційного зонду («Юнона» Беларусь). Надалі проведення лапароскопія на базі гінекологічного відділення Обласної клінічної лікарні ім. Мечникова м. Дніпра для верифікації зовнішнього генітального ендометріозу. Відділення є клінічною базою кафедри акушерства і гінекології Дніпропетровської медичної академії.

Критерії включення: усі пацієнтки репродуктивного віку, не отримували гормональне лікування впродовж 6 місяців до операції, відсутність патології ендометрію, клінічно значимої міоми, що вимагає міомектомії.

Критерії виключення: онкологічні захворювання, запальні захворювання, ожиріння, порушення менструального циклу.

Для імуногістохімічного дослідження використовували непрямий імунопероксидазний метод із застосуванням 5 первинних моноклональних антитіл (TermoScientific, USA) до рецепторів естрадіолу (ER) і прогестерону (PGR), інгібітору апоптозу (bcl-2), чиннику клітинної інвазії (ММП-9) та проліферації (Ki-67). Для візуалізації результату реакції зв'язування

антигену з антитілом використовували систему детекції «Ultra Vision Quanto» (TermoScientific, USA). Дослідження проводилося на базі кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДМА. Результати імуногістохімічного дослідження оцінювали напівкількісним методом, обчислюючи коефіцієнти експресії антигенів, що вивчаються за загальноприйнятою схемою. Так, оцінка експресії ER та PGR проводилася у 10 полях зору при збільшенні мікроскопа x400, враховувався відсоток забарвлених клітин епітелію та інтенсивність експресії в них. Останній показник оцінювався у балах від 0 до 3 (негативна, слабка, помірна та виражена міра фарбування). Коефіцієнт експресії (H-score) розраховували для кожного спостереження по формулі: $H = B_1 \times \Pi + B_2 \times \Pi + B_3 \times \Pi$, де B – інтенсивність забарвлення в балах, Π – відсоток забарвлених клітин при кожному значення B. Рівень експресії bcl-2 та ММП-9 оцінювали візуально по інтенсивності забарвлення клітин у балах від 0 до 3 (негативне, слабке, помірне та виражене забарвлення). Результат експресії Ki-67 мав вираження у відсотках, що відображає кількість клітин з ядерним забарвленням на 100 клітин залозистого епітелію чи строми.

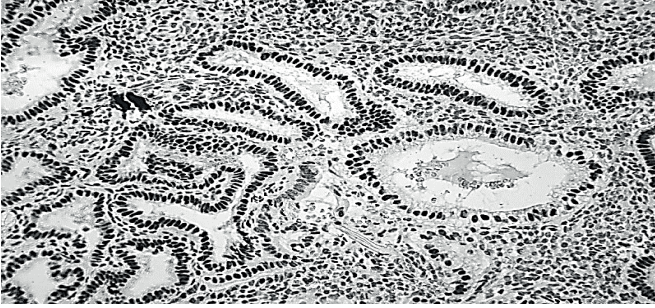
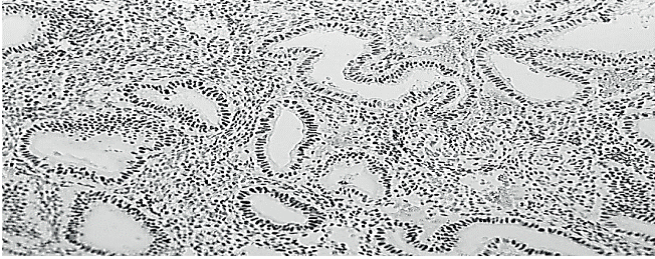
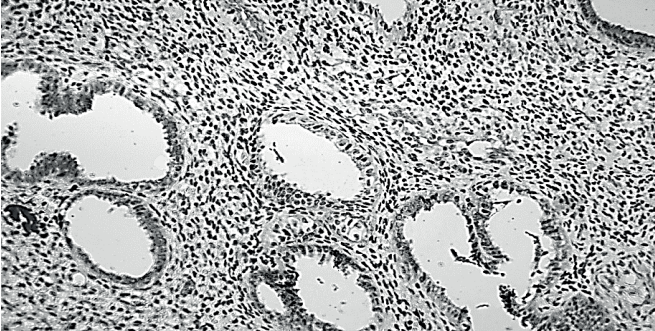
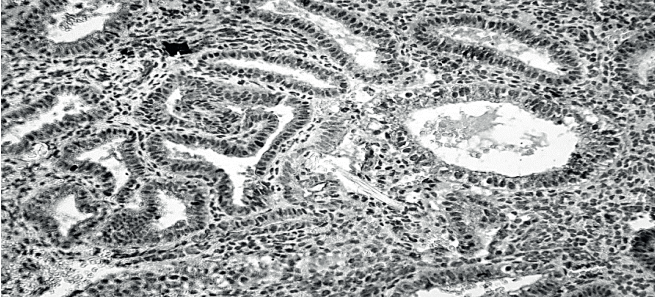
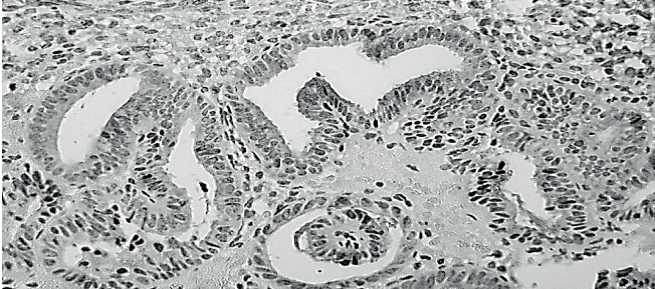
Для аналізу результатів використовували комп'ютерну програму Statsoft statistica 6.0 USA. У дослідженні було прийнято рівень статистичної значущості $p < 0,05$. Після перевірки нормальності розподілу використовувалися параметричні або непараметричні критерії. Визначались чутливість, специфічність, прогностична значимість позитивного та негативного результатів, а також діагностична точність запропонованого методу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У 2014 році нами був розроблений дизайн та проведено дослідження по вивченню експресії рецепторів естрадіолу та прогестерону, експресії маркера проліферації Ki-67, клітинної інвазії ММП-9 та інгібітору апоптозу bcl-2 в 47 зразках еутопічного та гетеротопічного ендометріїв у жінок репродуктивного віку з зовнішнім генітальним ендометріозом [2]. Зіставивши отримані дані з дослідженням зразків ендометрію здорових жінок, сформуливали характерний «анормальний» морфотип еутопічного ендометрію для зовнішнього генітального ендометріозу (табл. 1).

Таблиця 1

**Імуногістохімічна характеристика «анормального» морфотипу
еутопічного ендометрію з зовнішнім геніальним ендометріозом.**

Рівень експресії	Фото
2+/3+	 <p data-bbox="679 685 1241 712">Підвищена експресія рецепторів естрогенів у залозах</p>
1+/2+	 <p data-bbox="679 987 1241 1016">Знижена експресія рецепторів прогестерону в стромі</p>
2+	 <p data-bbox="762 1364 1158 1397">Підвищена експресія Vcl-2 у залозах</p>
3+	 <p data-bbox="762 1711 1158 1742">Виражена експресія ММП-9 у залозах</p>
44,5±3,1%	 <p data-bbox="786 2047 1134 2072">Виражена експресія Кі-у залозах</p>

Згідно розробленого дизайну, 64 жінкам репродуктивного віку з безпліддям в проліферативній фазі менструального циклу виконана була Pipell-біопсія ендометрію. Pipell-біопсія ендометрію виконувалась після отримання інформованої згоди пацієнтки, за допомогою аспіраційного зонду («Юнона» Беларусь). При наявності 2 та більше критеріїв, характерних для морфотипу ендометрію при ендометріозі, встановлювали «анормальний» морфотип. В процесі клінічного дослідження пацієнтки були розподілені а дві підгрупи: а – з «анормальним» та b – з «нормальним» морфотипом.

Надалі, по узгодженню, всім пацієнткам була виконана лапароскопія в проліферативній фазі за стандартною методикою з використанням комплекту ендоскопічного обладнання фірми „Karl Storz“ (Німеччина) з відеосистемою та електрокоагулятором. Для оцінки ступеню тяжкості ендометріозу використовували загальновизнану класифікацію ASRM.

При проведенні лапароскопії, зовнішній генітальний ендометріоз був верифікований (табл. 2) у 26 пацієнток з анормальним морфотипом еутопічного ендометрію (78,8%) і у 10 пацієнток з нормальним морфотипом ендометрію (32,2%). Ця різниця була статистично значимою ($p=0,008$).

Таблиця 2

Верифікації зовнішнього геніального ендометріозу по підгрупах

		Діагностовано ендометріоз, n		Загальна кількість, n
		так	ні	
Встановлено "анормальний" морфотип	Так (підгрупа a)	26	7	33
	Ні (підгрупа b)	10	21	31
Загальна кількість, n		36	28	64

На підставі отриманих даних визначили чутливість (вона склала 72,20%), специфічність (75%), прогностичну значимість позитивного (78,79%) та негативного результатів (67,74%) запропонованого нами методу діагностики зовнішнього геніального ендометріозу у жінок з безпліддям. Також прорахували діагностичну точність методу та зіставили отриманий нами результат з діагностичною точністю трансвагінального УЗД в діагностиці ендометріозу. Слід зазначити, що за даними різних авторів чутливість трансвагінального УЗД для діагностики ендометріозу взагалі коливається в досить широких межах, від 44% до 99% (Адамян Л.В. та співавтори, 2006). Група авторів Tom K Holland, Alfred Cutner, та інші у своєму дослідженні визначили діагностичну точність трансвагінального УЗД в залежності від стадій ендометріозу. Згідно представлених даних в BMCWomens Health у 2013 році діагностична точність при I стадії склала 10%, при II – 37,5% у порівнянні з отриманом нами показником 73,4%.

ВИСНОВКИ

Таким чином, поєднання декількох маркерів, виявлених при імуногістохімічному дослідженні еутопічного ендометрію, сприяє вдосконаленню методів діагностики ендометріозу. Також отримання біоптату ендометрію за допомогою Pipell- біопсії може бути запропоноване, оскільки є малоінвазивною, амбулаторною маніпуля-

цією. Все вище зазначене дозволить своєчасно верифікувати доклінічні та ранні клінічні стадії зовнішнього геніального ендометріозу у жінок з безпліддям та рекомендувати раннє оперативне втручання, яке надає максимальні результати відновлення репродуктивної функції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адамян Л.В., Азгурова Я.Б. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза // Проблемы репродукции, -№5, -2015, с.66-77.
2. Алтанець О.М., Медведєв М.В. Можливість використання комплексу імуногістохімічних маркерів на етапі до клінічної діагностики зовнішнього геніального ендометріозу у жінок з безпліддністю: прелімінарні дані // Одеський медичний журнал.-2018.-№2, -с. 22-26.
3. Богуславская Д.В., Lebovic D.I. Эндометриоз и бесплодие // Проблемы репродукции, - № 2, -2011, с. 69-74.
4. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Плотность нервных волокон и экспрессия ядерных изоформ рецепторов эстрогенов и прогестерона в эутопическом эндометрии у больных перитонеальной формой эндометриоза: влияние на наступление беременности // Проблемы репродукции, -№6, 2014, -С.61-69.
5. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Профиль гормонов и экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в эндометрии у больных с эндометриозом и бесплодием на фоне лечения // Проблемы репродукции, -№6, 2016, -С.66-75
6. Новикова Е.И. и др. Новые подходы к диагностике генитального эндометриоза // Омский научный вестник. 2012. №1-108. С. 44-48.

7. Londero AP, Calcagno A, Grassi T, Marzinotto S, Orsaria M, Survivin, MMP-2, MT1-MMP и TIMP-2: their impact on survival, implantation, and proliferation of endometrial tissues // *Virchows Arch* 2012;461 (5): 589-9
8. Johnson N. et al. Consensus on current management of endometriosis // *Hum. Reprod.* 2013. Vol. 28 (6). P. 1552-1568.
9. Begum T. Aetiology and pathogenesis of endometriosis — a review // *Mymensingh Med. J.* 2013. Vol. 22 (1). P. 218-221.
10. Yamanaka K. et al. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometrial stromal cells in spheroid culture // *Fertil. Steril.* 2012. Vol. 97 (2). P. 477-482.

РЕЗЮМЕ

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ БЕСПЛОДИИ У ЖЕНЩИН С ЛЕГКИМИ ФОРМАМИ ЭНДОМЕТРИОЗА

АЛТАНЕЦ Е. Н.,
МЕДВЕДЕВ М. В.

Несмотря на усовершенствование диагностики, эндометриоз диагностируют с большим опозданием. Особенно беспокойство вызывает субклинический эндометриоз у женщин с бесплодием. Несвоевременное лапароскопическое лечение у относительно бессимптомных женщин приводит к отсроченности наступления беременности, прогрессированию заболевания и значительному снижению фертильности.

Цель исследования – оценить частоту верификации диагноза наружный гентитальный эндометриоз при «нормальном» и «анормальном» морфотипах эутопического эндометрия у женщин с бесплодием.

Материалы и методы

Обследовано 64 женщины репродуктивного возраста с бесплодием. Всем пациенткам в пролиферативной фазе менструального цикла выполнена Pipell-биопсия эндометрия, в котором была изучена экспрессия рецепторов эстрогена, прогестерона, MMP-9, bcl-2 и ki-68.

Результаты исследования и их обсуждение

В статье представлены результаты изучения комплекса иммуногистохимических маркеров в образцах эутопического эндометрия у женщин с эндометриозом ассоциированным бесплодием. Определена чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов. Также просчитана

диагностическая точность предложенного метода.

Выводы

Комплекс иммуногистохимических маркеров может быть предложен в качестве малоинвазивной манипуляции для верификации начальных стадий эндометриоза у женщин с бесплодием.

Ключевые слова: эутопический эндометрий, эндометриоз, бесплодие, иммуногистохимические маркеры.

SUMMARY

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL ENDOMETRIAL STUDIES IN INFERTILITY IN WOMEN WITH MILD ENDOMETRIOSIS

ALTANETS O.M. MEDVEDEV M.V.

Despite the improvement of diagnosis, endometriosis is diagnosed with great delay. Of particular concern is subclinical endometriosis in women with infertility. Untimely laparoscopic treatment in relatively asymptomatic women leads to postponement of onset of pregnancy, progression of the disease and a significant reduction in fertility.

The purpose of the study was to evaluate the frequency of verifying the diagnosis of external genital endometriosis in “normal” and “abnormal” morphotypes of eutopic endometrium in women with infertility.

Materials and methods

64 women of reproductive age with infertility were examined. All patients in the proliferative phase of the menstrual cycle performed a Pipell-endometrium biopsy in which the expression of estrogen receptors, progesterone, MMP-9, bcl-2 and ki-68 was studied.

Results of the research and their discussion

The article presents the results of studying the complex of immunohistochemical markers in samples of eutopic endometrium in women with endometriosis associated with infertility. Sensitivity, specificity, prognostic significance of positive and negative results are determined. Also calculated diagnostic accuracy of the proposed method.

Conclusions

The complex of immunohistochemical markers can be proposed as a minimally invasive manipulation for verifying the initial stages of endometriosis in women with infertility.

Key words: eutopic endometrium, endometriosis, infertility, immunohistochemical markers.