УДК:618.145-007.61

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН ЕНДОМЕТРІЯ У ХВОРИХ ІЗ ГЛИБОКИМ ІНФІЛЬТРАТИВНИМ ЕНДОМЕТРІОЗОМ

Н.М. РОЖКОВСЬКА
д. мед. н., професор кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету

О.М. СТЕПАНОВИЧУС
к. мед. н., асистент кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету

Контакти:
Рожковська Наталія Миколаївна
Одеський національний медичний університет, кафедра акушерства та гінекології № 1
65000, Одеса, пров. Валіховський, 2
тел.: +38 (048) 723-33-24
e-mail: nrozhkovska@ukr.net

ВСТУП

Зовнішній генітальний ендометріоз належить до найбільш розповсюджених захворювань жіночої статевої системи, посідаючи третє місце у структурі гінекологічної патології після запальних процесів та міоми матки [1, 2]. Ризик розвитку неплідності при зовнішньому генітальному ендометріозі у пацієнток репродуктивного віку підвищується в 20 разів. Нині немає сумнівів у тому, що зовнішній генітальний ендометріоз є причиною неплідності кожної третьої жінки.

АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ТА ПОСТАНОВКА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

Однак, незважаючи на суттєві досягнення у вивченні проблеми генітального ендометріозу, патогенез цього захворювання остаточно не з'ясований [3]. Більшість дослідників виділяє три основні форми зовнішнього генітального ендометріозу: поверхневий перитонеальний, глибокий інфільтративний ендометріоз та ендометріоми яєчників. Зокрема, досі залишається неясною роль процесів дозрівання та диференціації дендритних клітин в еутопічному та гетеротопічному ендометрії при зовнішньому генітальному ендометріозі у прогресуванні захворювання та визначенні прогнозу щодо відновлення фертильної функції [4, 5].

Метою дослідження була оцінка функціонального стану антигенпрезентуючих клітин ендометрія і перитонеальної рідини у хворих із глибоким інфільтративним ендометріозом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилося на клінічній базі кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету, у гінекологічному відділенні клінічної лікарні № 9 м. Одеси у 2007–2014 рр. Під спостереженням перебувало 120 неплідних пацієнток із верифікованим глибоким інфільтративним ендометріозом. В якості контролю було обстежено 30 практично здорових жінок віком від 18 до 35 років, які звернулися до лікаря для огляду за програмами допоміжних репродуктивних технологій через чоловічий фактор неплідності.

Всі хворі були обстежені згідно з чинними клінічними протоколами (накази МОЗ України від 15.12.2003 № 582 та від 31.12.2004 № 676). Проводили загальноклінічне обстеження, вивчали інфектологічний статус пацієнток за допомогою методів прямої мікроскопії зіскрібків цервікального каналу після фарбування за Романовським–Гімзою, імуноферментного та імунофлюоресцентного методів індикації (тест-системи Sigma, США). Для експрес-діагностики вірусу простого герпесу використовували метод флюоресцуючих антитіл та імунопероксидазний метод (тест-системи Sigma, США). При виявленні запального захворювання інфекційного ґенезу жінку виключали із загальної вибірки, замінюючи її наступною кандидаткою з дотриманням процедури рандомізації.

Первинний огляд усіх пацієнток передбачав проведення кольпоскопії за допомогою кольпоскопу SCANER MK-200. До початку лікування і протягом контрольних обстежень проводилося УЗД органів малого тазу, на 5–7-й і 22–24-й дні менструального циклу з використанням трансабдомінального і трансвагінального сенсорів.

За необхідності стан матки і маткових труб оцінювали за допомогою рентгенологічного дослідження органів малого тазу на 5–7-й день менструального циклу з використанням рентгеноконтрастної водорозчинної речовини – 76% розчину тріомбрасту у кількості 20 мл.

Для оцінки гормональної активності яєчників і наявності овуляції вимірювали рівень фолікулостимулюючого, лютеїнізуючого гормонів, пролактину, естрадіолу, тестостерону, дегідроепіандростерону сульфату, тиреотропного гормону, трийодтироніну, тетрайодтироніну у плазмі крові у фолікулінову фазу на 2–3-й день менструального циклу. В II фазу циклу, на 20–22-й день, визначали рівень прогестерону з метою оцінки повноцінності овуляції та функції жовтого тіла.

З метою діагностики цервікального фактора неплідності виконували посткоїтальний тест (пробу Шуварського-Хунера). Обстеження неплідних подружніх пар проводилося за участю андролога з метою виключення чоловічого фактора неплідності.

Імунологічні дослідження функціонального стану імунокомпетентних клітин здійснювали за наступними методиками. Перитонеальні макрофаги одержували з суспензії, узятої методом аспірації під час лапароскопічного втручання у кількості 10–15 мл. Перитонеальну рідину збирали в охолоджені до 0 °С силіконізовані центрифужні пробірки. Забруднену кров'ю рідину не використовували. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 10 хв. при 150 g, ресуспендували осад у розчині Хенкса. Клітини забарвлювали кристалічним фіолетовим або нейтральним червоним, ідентифікували і підраховували. Залежно від густоти суспензії її розводили в піпетці для лейкоцитів або еритроцитів розчином одного з барвників і переносили до камери Горяєва, після чого підраховували клітинні елементи за допомогою світлового мікроскопу (ЛОМО, м. Санкт-Петербург, Росія).

З метою оцінки стану місцевого імунітету та особливостей функціонування антигенпрезентуючих клітин визначали вміст CD-рецепторів дендритних клітин у біоптатах ендометріальних ектопій імуногістохімічним методом з використанням моноклональних антитіл до CD1a і CD23 Dako Inc. (США). Матеріал для досліджень одержували під час лапароскопічного втручання, а також шляхом виконання біопсії слизової оболонки тіла матки пацієнтки за 2–3 дні до передбачуваного терміну менструації кюреткою типу Пайпель або фракційного лікувально-діагностичного вишкрібання слизової оболонки порожнини матки і цервікального каналу.

Біоптати у вигляді зрізів товщиною 4 мм обробляли моноклональними мишачими антилюдськими антитілами до CD1a (розведення 1:100; Dako Cytomation, Carpinteria, США) та до CD23 (розведення 1:100; Dako Cytomation, Carpinteria, США) протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Реакцію проводили при pH = 9, концентрацію протонів підтримували за допомогою трифосфатного буферного розчину (Dako, Австралія). Перед інкубацією з первинними антитілами зрізи промивали у трифосфатному буфері та інкубували з біотин-навантаженими вторинними антитілами REAL Link (Dako, Австралія). У подальшому зрізи відмивали та забарвлювали червоним хромогеном (Dako, Австралія) протягом 10 хв. Перед оцінкою слайди були повторно забарвлені гематоксиліном Майера. При виконанні імуногістохімічних досліджень використовували автоматичну систему Dako Autostainer Model S3400 (Dako, США). Мікрофотографії зрізів виконували за допомогою мікроскопу Olympus BX51 та цифровою камерою DP70 (Olympus, Японія). Подальша обробка цифрового оптичного зображення проводилася за допомогою програмного забезпечення Image Pro Plus Discovery (Media Cybernetics, США).

Окремо аналізували зрізи базального та функціонального ендометрія, наявність клітинних елементів перитонеального мезотелію. Оцінювали інтенсивність забарвлення у балах, підраховували кількість CD1a- та CD23-позитивних клітин у полі зору на мікропрепаратах площею 250 мм^2.

З метою відновлення антигенів проводили депарафінізацію заздалегідь підготованих препаратів еутопічного та гетеротопічного ендометрія, з наступною регідратацією за допомогою набору реактивів EnVision FLEX (США).

Статистичну обробку проводили з використанням програмного забезпечення Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз клініко-анамнестичних даних показав, що середній вік обстежених хворих на глибокий інфільтративний ендометріоз становив 25,6 ± 1,8 років. При цьому після рандомізованого розподілу хворих по клінічних групах середній вік пацієнток у I групі склав 24,9 ± 0,9 років, у II групі – 26,5 ± 1,9 років, у контрольній групі – 25,1 ± 0,7 років, тобто достовірних відмінностей між групами за віковими характеристиками визначено не було (p > 0,05).

Середня тривалість захворювання коливалась у межах від 5 до 7 років і в середньому склала 5,5 ± 1,3 року. Первинна неплідність зустрічалась у 78 (65%) хворих, вторинна – у 42 (35%).

Серед клінічних проявів захворювання частіше зустрічались скарги на хронічний тазовий біль – у 83 (69,2%) пацієнток, дисменорею – у 59 (49,2%), диспареунію – у 46 (38,3%). Поряд із цим у 20 (16,7%) пацієнток були відсутні інші прояви захворювання, крім неплідності. Серед неплідних подружніх пар чоловічий фактор спостерігався у 32 (26,7%) випадках.

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що експресія CD1a та CD23 у гетеротопічному та еутопічному ендометрії відрізнялася (таблиця).

Характерним було зниження активності зрілих дендритних клітин до 5,2 ± 0,5 клітин/мм^2 CD23 у функціональному шарі ендометрія та до 6,0 ± 0,5 клітин/мм^2 у базальному шарі, а також підвищення активності незрілих дендритних клітин у базальному шарі – CD1a до 34,2 ± 1,2 клітин/мм^2. Відмінності між зразками за названими показниками були достовірними (p < 0,05).

Об'єм аспірованої перитонеальної рідини у хворих на зовнішній генітальний ендометріоз у середньому склав 30 ± 1,5 мл, у контрольній групі – 10,0 ± 1,1 мл. Це відповідає даним інших дослідників: у нормі об'єм перитонеальної рідини становить у першу фазу менструального циклу 7–8 мл, а у другу фазу – 13–18 мл [4].

У пацієнток із глибоким генітальним ендометріозом на момент проведення лапароскопічного оперативного втручання кількість макрофагів у перитонеальній рідині була збільшена у 1,5–1,8 разів. Якщо у здорових жінок, які увійшли до контрольної групи, перитонеальна рідина містила від 7 до 12 млн лейкоцитів, представлених переважно макрофагами (90%), лімфоцитами (5–10%) і поліморфноядерними лейкоцитами (до 5%), то у жінок, хворих на глибокий генітальний ендометріоз, кількість макрофагів зростала до 95% за рахунок відносного збіднення популяції поліморфноядерних лейкоцитів. При цьому загальна кількість клітин у перитонеальній рідині зростала до 18–20 млн в 1 мл.

ТАБЛИЦЯ. ЕКСПРЕСІЯ CD1a І CD23 У ГЕТЕРОПІЧНОМУ ТА ЕУТОПІЧНОМУ ЕНДОМЕТРІЇ (КЛІТИН/мм^2)

Показники	Еутопічний ендометрій		Гетеротопічний ендометрій	
	Функціональний шар	Базальний шар	Функціональний шар	Базальний шар
CD1a	15,9 ± 1,2	28,8 ± 1,4	17,5 ± 1,8	34,2 ± 1,2*
CD23	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	5,2 ± 0,5*	6,0 ± 0,5*

* відмінності між еутопічним та гетеротопічним ендометрієм є достовірними (p < 0,05)

ВИСНОВКИ

1. При дослідженні перитонеальної рідини на вміст маркерів функціонального стану імунокомпетентних клітин встановлено, що у здорових жінок, які увійшли до контрольної групи, перитонеальна рідина у 3–15 мл містила від 7 до 12 млн лейкоцитів, представлених переважно макрофагами (90%), лімфоцитами (5–10%) і поліморфноядерними лейкоцитами (до 5%), тоді як у жінок, хворих на зовнішній генітальний ендометріоз, кількість макрофагів зростала до 95% за рахунок відносного збіднення популяції поліморфноядерних лейкоцитів. При цьому загальна кількість клітин у перитонеальній рідині зростала до 18–20 млн в 1 мл.

2. Характерною особливістю для пацієнток із глибоким інфільтративним ендометріозом є зниження активності зрілих дендритних клітин (до 5,2 ± 0,5 клітин/мм^2 CD23 у функціональному шарі та до 6,0 ± 0,5 клітин/мм^2 у базальному шарі ендометрія), а також підвищення активності незрілих дендритних клітин у базальному шарі (CD1a до 34,2 ± 1,2 клітин/мм^2). Відмінності між зразками за названими показниками були достовірними ($p < 0,05$).

Таким чином, виявлені особливості функціонального стану антигенпрезентуючих клітин ендометрія у хворих із глибоким інфільтративним ендометріозом можуть бути використані як додаткові критерії діагностики та лікування з метою покращення репродуктивних результатів.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Schulke, L., Berbic, M., Manconi, F., et al.
"Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis." Hum Reprod, 24(7) (2009): 1695-1703.

2. Nouri, K., Ott, J., Krupitz, B., Huber, J.C., Wenzl, R.
"Family incidence of endometriosis in first-, second-, and third-degree relatives: case-control study." Reprod Biol Endocrinol, 8(2010): 85–91.

3. Tanmahasamut, P., Noothong, S., Sanga-Areekul, N., et al.
"Prevalence of endometriosis in women undergoing surgery for benign gynecologic diseases." J Med Assoc Thai, 97(2) (2014): 147-152.

4. Pencovich, N., Luk, J., Hantisteanu, S., et al.
"The development of endometriosis in a murine model is dependent on the presence of dendritic cells." Reprod Biomed Online, 28(4) (2014): 515-521.

5. Рожковська, Н.М.
Фактори неплідності при зовнішньому генітальному ендометріозі / Н.М. Рожковська, А.Г. Волянська, О.М. Степановичус // Труди Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського. — 2008. — Т. 144, Ч. III. — С. 219–221.
Rozhkovska, N.M., Volianska, A.G., Stepanovychus, O.M.
"Infertility factors in the external genital endometriosis." Proceedings of the Crimean State Medical University named after SI Georgievskiy, 144(III) (2008): 219-221.

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН ЕНДОМЕТРІЯ У ХВОРИХ ІЗ ГЛИБОКИМ ІНФІЛЬТРАТИВНИМ ЕНДОМЕТРІОЗОМ

Н.М. Рожковська, д. мед. н., професор кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету
О.М. Степановичус, к. мед. н., асистент кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету

Проведено дослідження, метою якого була оцінка функціонального стану антигенпрезентуючих клітин ендометрія у хворих із тяжкими формами зовнішнього генітального ендометріозу.

Показано, що у здорових жінок, які увійшли до контрольної групи, перитонеальна рідина у 3–15 мл містила від 7 до 12 млн лейкоцитів, представлених переважно макрофагами (90%), лімфоцитами (5–10%) і поліморфноядерними лейкоцитами (до 5%), тоді як у жінок, хворих на зовнішній генітальний ендометріоз, кількість макрофагів зростала до 95% за рахунок відносного збіднення популяції поліморфноядерних лейкоцитів. При цьому загальна кількість клітин у перитонеальній рідині зростала до 18–20 млн в 1 мл. Характерним для пацієнток із зовнішнім генітальним ендометріозом є зниження активності зрілих дендритних клітин (до 5,2 ± 0,5 клітин/мм^2 CD23 у функціональному шарі та до 6,0 ± 0,5 клітин/мм^2 у базальному шарі ендометрія) та підвищення активності незрілих дендритних клітин у базальному шарі (CD1a до 34,2 ± 1,2 клітин/мм^2).

Ключові слова: зовнішній генітальний ендометріоз, імунітет, антигенпрезентуючі клітини.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ У БОЛЬНЫХ С ГЛУБОКИМ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Н.Н. Рожковская, д. мед. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета
Е.Н. Степановичус, к. мед. н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета

Проведено исследование, целью которого была оценка функционального состояния антигенпрезентирующих клеток эндометрия у больных с тяжелыми формами наружного генитального эндометриоза.

Показано, что у здоровых женщин, вошедших в контрольную группу, перитонеальная жидкость в 3–15 мл содержала от 7 до 12 млн лейкоцитов, представленных преимущественно макрофагами (90%), лимфоцитами (5–10%) и полиморфноядерными лейкоцитами (до 5%), в то время как у женщин, больных наружным генитальным эндометриозом, количество макрофагов возрастало до 95% за счет относительного обеднения популяции полиморфноядерных лейкоцитов. При этом общее количество клеток в перитонеальной жидкости возрастало до 18–20 млн в 1 мл. Характерным для пациенток с наружным генитальным эндометриозом является снижение активности зрелых дендритных клеток эндометрия (до 5,2 ± 0,5 клеток/мм^2 CD23 в функциональном слое и до 6,0 ± 0,5 клеток/мм^2 в базальном слое) и повышение активности незрелых дендритных клеток в базальном слое (CD1a до 34,2 ± 1,2 клеток/мм^2).

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, иммунитет, антигенпрезентирующие клетки.

PECULARITIES OF FUNCTIONAL STATE OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS OF THE ENDOMETRIUM IN PATIENTS WITH DEEP INFILTRATING ENDOMETRIOSIS

N.M. Rozhkovska, MD, professor at the Obstetrics and Gynecology Department number 1 of Odesa National Medical University
E.N. Stepanovichus, PhD, assistant at the Obstetrics and Gynecology Department number 1 of Odesa National Medical University

The aim of the study was to evaluate the functional state of antigen-presenting endometrial cells in patients with external genital endometriosis.

It is shown that in healthy women in the control group peritoneal fluid contains from 7 to 12 million white blood cells in 3–15 ml, represented mainly by macrophages (90%), lymphocytes (5–10%) and polymorphonuclear leukocytes (up to 5%), whereas in women with external genital endometriosis number of macrophages increased to 95% due to the relative impoverishment of the population of polymorphonuclear leukocytes. The total number of cells in the peritoneal fluid increased to 18–20 million in 1 ml. In patients with external endometriosis in the endometrium the activity of mature dendritic cells reduced (up to 5,2 ± 0,5 cells/mm^2 CD23 in the functional layer and to 6,0 ± 0,5 cells/mm^2 in the basal layer), and increased activity of immature dendritic cells in the basal layer (CD1a to 34,2 ± 1,2 cells/mm^2).

Keywords: external genital endometriosis, immunity, antigen-presenting cells.