



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53241 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/53МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНОГО ЕНДОМЕТРИТУ У ПАЦІЄНТОК ІЗ БЕЗПЛІДДЯМ

1

(21) u201005020

(22) 26.04.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл. № 18, 2010 р.

(72) ЧАЙКА АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, НОСЕНКО ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, САЄНКО АЛЛА ІВАНІВНА, АЙЗЯТУЛОВА ЕЛЬМІРА МАКСУТІВНА, СЕЛЕЗНЬОВ ОЛЕКСІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ПОСТОЛЮК ІРИНА ГЕОРГІЇВНА

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО

(57) Спосіб діагностики хронічного ендометриту у пацієнток із безпліддям шляхом проведення гістероскопії з біопсією ендометрія на 20-21-й день менструального циклу, занурення отриманих при гістероскопії зразків ендометрія в нейтральний забуферений розчин формальдегіду та фіксування впродовж 24 годин, дегідратації та заливання в парафін зразків ендометрія, виготовлення серійних гістологічних зрізів, розміщення зрізів на стеклах, фарбування їх гематоксиліном й еозином, проведення мікроскопічних досліджень препаратів,

2

аналізування одержаних результатів і виявлення поверхневого стромального набряку, стромального запального інфільтрату з лімфоцитів, лейкоцитів із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності, який **відрізняється** тим, що додатково зрізи регідратують у розчині етилового спирту з поступовим зниженням концентрації від 95 % до 50 %, піддають термічній обробці в мікрохвильовій печі при температурі 100 °С, блокують неспецифічне зв'язування білків на зрізах протеїновим блоком, ендогенну пероксидазну активність - пероксидазним блоком, наносять на зрізи моноклональні антитіла до епітопу людини синдекану-1 CD138+ та візуалізують первинні антитіла, дофарбовують зрізи гематоксиліном й еозином, укладають в напівсинтетичні середовища, покривають покривними стеклами, проводять світлову мікроскопію і, в разі візуалізації в зрізах ендометрія плазматичних клітин, імунопозитивних до епітопу людського синдекану-1 CD138+, діагностують хронічний ендометрит.

Корисна модель належить до медицини, точніше до гінекології, і може бути використана для діагностики хронічного ендометриту (ХЕ) у пацієнток з безпліддям.

ХЕ - клініко-морфологічний синдром, при якому в результаті персистуючого пошкодження ендометрія інфекційним агентом виникають множинні вторинні морфофункціональні зміни, що порушують циклічну трансформацію та рецепторний статус слизової оболонки тіла матки. Порушення репродуктивної функції - одна з основних скарг хворих на ХЕ. У хворих із безпліддям частота ХЕ складає в середньому 9,8% (7,8-15,4%). Серед жінок із верифікованим ХЕ в 60,4% випадків діагностують безпліддя (у 24,8% - первинне безпліддя, в 35,6% - вторинне), невдалі спроби екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) і перенесення ембріонів в анамнезі відзначено у 37% жінок. Труднощі діагностики, клінічної та морфологічної верифікації ХЕ впливають на оцінку частоти захворювання. Частота ХЕ від загального числа біопсій ендометрія коливається від 2,3% до 19,2%. Діагностичні підходи верифікації ХЕ безперервно ви-

дозмінювались протягом останніх десятиліть: від формулювання «діагнозу розпачу» після виключення інших причин, що викликають порушення менструального циклу, до «золотих стандартів» морфологічного підходу, який дозволив ширше поглянути на цю проблему.

Відомий спосіб діагностики ХЕ у пацієнток з безпліддям, оснований на ультразвуковому дослідженні (УЗД) органів малого таза (Е.Б. Рудакова, С.И. Мозговой, М.А. Пилипенко и др. Хронический эндометрит: от совершенствования диагностического подхода к оптимизации лечения / Лечащий врач. -2008. -№10), який включає виявлення змін структури ендометрія (виникнення в зоні середнього М-ехо ділянок підвищеної ехогенності), пухирців газу в порожнині матки, гіперехогенних вогнищ фіброзу, кальцинозу в базальному шарі ендометрія, розширення порожнини матки до 0,3-0,7 см за рахунок рідини.

Недоліком відомого способу є недостатня точність діагностики через визначення якісних, а не кількісних діагностичних характеристик.

(13) U

(11) 53241

(19) UA

Відомий, обраний за найближчий аналог - спосіб діагностики ХЕ у пацієнок із безпліддям (Хмельницький О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний.- Санкт-Петербург: СОТИС, 1994. -С. 136-144) шляхом проведення на 20-21-й день менструального циклу (МЦ) гістероскопії з біопсією ендометрія, занурення отриманих при гістероскопії зразків ендометрія в нейтральний забуферений розчин формальдегіду та фіксування впродовж 24 годин, дегідратації та заливання в парафін зразків ендометрія, виготовлення серійних гістологічних зрізів, розміщення зрізів на стеклах, фарбування їх гематоксиліном й еозином, проведення мікроскопічних досліджень препаратів, аналізування одержаних результатів та виявляння поверхневого стромального набряку, стромально-го запального інфільтрату з лімфоцитів, лейкоцитів і плазматичних клітин із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності.

Недоліками відомого способу є недостатня точність діагностики ХЕ через низьку чутливість гістологічного методу діагностики за допомогою фарбування зразків ендометрія гематоксиліном й еозином, яка складає 51,67%.

В основу корисної моделі поставлено задачу в способі діагностики ХЕ у пацієнок із безпліддям шляхом проведення додаткового імуногістохімічного дослідження для визначення нової діагностичної характеристики забезпечити підвищення чутливості методики. Застосування розробленого способу підвищує чутливість діагностики ХЕ порівняно з прототипом на 49,33% (з 51,67% до 100%), тобто в 1,94 разу ($p < 0,0001$).

Поставлена задача вирішується тим, що створено спосіб діагностики ХЕ у пацієнок із безпліддям шляхом проведення гістероскопії з біопсією ендометрія на 20-21-й день МЦ, занурення отриманих при гістероскопії зразків ендометрія в нейтральний забуферений розчин формальдегіду та фіксування впродовж 24 годин, дегідратації та заливання в парафін зразків ендометрія, виготовлення серійних гістологічних зрізів, розміщення зрізів на стеклах, фарбування їх гематоксиліном й еозином, проведення мікроскопічних досліджень препаратів, аналізування одержаних результатів і виявляння поверхневого стромального набряку, стромального запального інфільтрату з лімфоцитів, лейкоцитів із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності.

Новим у заявленому способі є те, що додатково зрізи регідратують у розчині етилового спирту з поступовим зниженням концентрації від 95% до 50%, піддають термічній обробці в мікрохвильовій печі при температурі 100°C, блокують неспецифічне зв'язування білків на зрізах протейновим блоком, ендогенну пероксидазну активність - пероксидазним блоком, наносять на зрізи моноклональні антитіла до епітопу людини синдекану-1 CD 138+ та візуалізують первинні антитіла, дофарбовують зрізи гематоксиліном й еозином, укладають в напівсинтетичні середовища, покривають покривними стеклами, проводять світлову мікроскопію і, в разі візуалізації в зрізах ендометрія плазматичних клі-

тин, імунопозитивних до епітопу людини синдекану-1 CD138+, діагностують ХЕ.

Між сукупністю суттєвих ознак корисної моделі та технічним результатом, якого можна досягти при її реалізації, існує причинно-наслідковий зв'язок.

За відомим способом-найближчим аналогом діагностують класичні морфологічні особливості ХЕ, які включають наявність поверхневого стромального набряку; стромального запального інфільтрату з лімфоцитів, лейкоцитів і плазматичних клітин із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності. При цьому, при ХЕ спостерігають невідповідність ендометрія дню та фазі МЦ в здоровому стані. Ступінь стромального запального інфільтрату з лімфоцитів може бути у вигляді: поодиноких лімфоцитів, вогнищевої, розсіяної або дифузної інфільтрації з периваскулярною та/або перигландулярною локалізацією. При ХЕ також спостерігається колагенізація строми (слабка, помірна, виражена). Однак, не всі випадки ХЕ в наш час мають ці класичні морфологічні риси. ХЕ гістологічно можуть імітувати зразки біоптатів ендометрія, які відповідають фазі десквамації, фазі проліферації, інфільтровані моноклеарними клітинами, такі, що мають ясні стромальні мітози, розповсюдження плазматичних клітин або виражену предцидуальну реакцію в секреторній фазі. Лімфоцити, у тому числі природні кілери, і лімфоїдні інфільтрати є нормальним компонентом ендометрія й особливі характерні для передменструального і менструального періодів. Додатковими факторами похибок можуть стати, у тому числі, недостатній досвід, втома та брак часу, що може призвести до помилкового діагнозу. Все це вимагає більш точної оцінки зразків ендометрія.

Наявність плазмоцитів широко розглядається як найкорисніший критерій для діагностики ендометриту, хоча вони часто змішуються з іншими запальними клітинами та можуть бути компонентом запальних інфільтратів. Плазмоцити є ефекторними клітинами гуморального імунітету. Утворюються плазмоцити з плюріпотентних стоволових клітин крові та В-лімфоцитів при впливі на них антигенних речовин. Опції плазмоцитів полягають у синтезі та виділенні в міжклітинне середовище антитіл - імуноглобулінів. Число плазмоцитів відображає інтенсивність імунних реакцій. Слід підкреслити, що за відсутності інших морфологічних ознак ендометриту, вичерпний пошук плазмоцитів не є виправданим. Іноді стромальні плазмоцити можуть бути при поліпах і злоякісних новоутвореннях. Варіант ендометриту, так званий "координативний некротичний ендометрит", характеризується наявністю запальних інфільтратів у складі лімфоцитів, нейтрофілів і гістіоцитів без плазмоцитів. Гранульоматозний ендометрит спостерігають при саркоїдозі, туберкульозі та інших гранульоматозних захворюваннях.

Синдекан-1 - протеоглікан поверхні клітин, який експресується плазмоцитами та кератиноцитами, але не моноцитами, лімфоцитами чи стромальними клітинами ендометрія. Він використову-

ється як маркер для виявлення плазматичних клітин в заключених в парафін зрізах тканин.

За відомим способом-аналогом при гістологічному дослідженні зразків ендометрія лімфогістіоцитарні інфільтрати зустрічаються як у нормі, так і при патології. Наявність в лімфогістіоцитарних інфільтратах плазматичних клітин підтверджує наявність ХЕ. Однак існують труднощі при гістологічній ідентифікації плазматичних клітин в стромальних інфільтратах при фарбуванні гематоксиліном й еозином внаслідок скупченості клітин інфільтратів і неможливості ідентифікувати серед них плазмоцити, до похибок можуть також призвести недостатній досвід, втома і брак часу. Внаслідок цього може бути як гіпердіагностика ХЕ, так і помилковий його діагноз, подовжений термін лікування, проведена неадекватна терапія. Імуногістохімічне забарвлення мишачими моноклональними антитілами до епітопу людини синдекану-1 CD 138+ дозволяє виявити плазмоцити в лімфогістіоцитарних інфільтратах, а також у стромі ендометрія, тому що Т-лімфоцити та клітини стромы ендометрія не реагують із цими антитілами.

Ефективність діагностики ХЕ у жінок із безпліддям за заявленим способом доведена шляхом клінічних досліджень. В гінекологічній клініці були обстежені 60 жінок (20-45 років) з безпліддям та підозрою на ХЕ. Всі хворі мали порівнювану тривалість захворювання. В комплекс обстежень включали гістероскопію з забором гістологічних проб біологічних тканин ендометрія. Досліджено зразки ендометрія від 60 пацієнток з безпліддям та підозрою на ХЕ на 20-21-день МЦ. День вибору МЦ важливий, оскільки і наявність і видовий склад лімфоцитів в ендометрії залежать від дня циклу. В ці дні настає фаза МЦ пізньої проліферації та ранньої секреції. Проведення діагностування саме в ці дні підвищує точність діагностики. В усіх зразках при фарбуванні гематоксиліном й еозином в ендометрії за відомим способом-прототипом реєстрували поверхневий стромальний набряк, стромальний запальний інфільтрат із лімфоцитів, лейкоцитів і плазматичних клітин із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності, що за критеріями відомого способу-прототипу свідчило про наявність ХЕ у всіх 60 піддослідних пацієнток.

Для підтвердження діагнозу ХЕ за способом, що заявляється, було проведено уточнення складу лімфогістіоцитарних інфільтратів шляхом додаткового фарбування зрізів ендометрія мишачими моноклональними антитілами до епітопу людини синдекану-1 CD 138+. В 31 (51,67%) випадку за даними імуногістохімічного дослідження згідно зі способом, що заявляється, в складі лімфогістіоцитарних інфільтратів підтверджено наявність плазматичних клітин. За результатами дослідження виставили діагноз ХЕ 31 пацієнтці із 60. Іншим 29 пацієнткам, у котрих в складі лімфогістіоцитарних інфільтратів не підтверджена наявність плазмоцитів, діагноз ХЕ не підтверджено.

Таким чином, чутливість гістологічного методу діагностики ХЕ за допомогою фарбування зразків ендометрія гематоксиліном й еозином за способом-прототипом складає лише 51,67%, тоді як

розробленого методу із включенням імуногістохімічних досліджень - 100%. Застосування розробленого способу підвищує чутливість діагностики ХЕ на 49,33%, тобто в 1,94 рази ($p < 0,0001$).

Спосіб діагностики ХЕ у пацієнток із безпліддям, що заявляється, виконують наступним чином. На 20-21-й день МЦ проводять гістероскопію з біопсією ендометрія. Потім отримані при гістероскопії зразки ендометрія занурюють в нейтральний забуферений розчин формальдегіду (рН 7,4) та фіксують впродовж 24 годин. Далі проводять дегідратацію та заливають в парафін зразки ендометрія за стандартною методикою. На ротаційному мікротомі Microm HM325 із системою переносу зрізів STS («Carl Zeiss», ФРН) виготовляють серійні гістологічні зрізи товщиною 3-4 мкм, які потім фарбують гематоксиліном й еозином. Проводять мікроскопічні дослідження препаратів. Аналізують одержані результати на предмет виявлення поверхневого стромального набряку, стромального запального інфільтрату з лімфоцитів, лейкоцитів і плазматичних клітин із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності. Для імуногістохімічного дослідження зрізи поміщають на покриті адгезивом стекла Super Frost Plus («Menzel», ФРН). Додатково зрізи регідратують у розчині етилового спирту з поступовим зниженням концентрації від 95% до 50%. Для «демаскування» антигенів регідратовані зрізи піддають термічній обробці в розчині Target Retrieval Solution («DAKO», Данія) при температурі 100°C з використанням мікрохвильової печі "Samsung CE118KFR". Блокують неспецифічне зв'язування білків на зрізах протеїновим блоком («DAKO», Данія), ендогенну пероксидазну активність - пероксидазним блоком («DAKO», Данія), наносять на зрізи моноклональні антитіла до епітопу людини синдекану-1 CD 138+ (клон M15, «Dako»). Первинні антитіла візуалізують за допомогою високочутливої полімерної системи детекції «DAKO Advance». Для пероксидази хрому використовують субстрат DAB+ («DAKO», Данія). Далі дофарбовують зрізи гематоксиліном Майєра й еозином. Пофарбовані зрізи укладають в напівсинтетичні середовища Permanent Mounting Medium («DAKO», Данія), покривають покривними стеклами. Мікроскопію препаратів і морфометричні дослідження проводять на мікроскопі Olympus AX70 Provis («Olympus», Японія) за допомогою програми аналізу зображення Analysis 3.2 Pro («Soft Imaging», ФРН) згідно з рекомендаціями розробника програмного забезпечення. В разі візуалізації в зрізах ендометрія плазматичних клітин, імунопозитивних до епітопу людини синдекану-1 CD138+, діагностують ХЕ.

Наводимо конкретні приклади реалізації способу діагностики ХЕ у пацієнток із безпліддям, що заявляється.

Приклад 1. Пацієнтка К., 28 років, звернулася до гінеколога зі скаргами на безпліддя впродовж 7 років. Менструації з 12 років, регулярні, по 5 днів через 28, безболісні, помірні. В анамнезі 2 штучних абортів, проліковані уреоплазмоз, хламідіоз. З приводу двосторонніх сактосальпінксів виконана лапароскопія, двостороння сальпінгоектомія. У

чоловіка - нормоспермія. Проведено 2 спроби ЕКЗ, після яких наступала біохімічна вагітність, але клінічної не було. В клініці хвора К., з підозрою на ХЕ, була обстежена для діагностики ХЕ за відомим способом-аналогом. З метою з'ясування стану ендометрія на 20-й день МЦ хворій К. виконали гістероскопію та біопсію ендометрія. Отримані зразки ендометрія занурили в нейтральний забуферений розчин формальдегіду та фіксували впродовж 24 годин. Далі зразки дегідрували та залили в парафін. Виготовлені серійні гістологічні зрізи розмістили на стеклах, пофарбували гематоксиліном й еозином, провели мікроскопічне дослідження препаратів. В ендометрії виявили стромальні інфільтрати з лімфоцитів, лейкоцитів із лейкоцитарним проникненням у залози, а також зростання стромальної щільності. Плазматичні клітини не реєстрували, тому за відомим способом-прототипом діагноз ХЕ у хворой К. відхилено.

Для уточнення діагнозу хворій К. провели додаткове імуногістохімічне дослідження зразків ендометрія за способом, що заявляється. Додатково зрізи регідрували у розчині етилового спирту з поступовим зниженням концентрації від 95% до 50%, піддали термічній обробці в мікрохвильовій печі при температурі 100°C, блокували неспецифічне зв'язування білків на зрізах протейновим блоком, ендогенну пероксидазну активність - пероксидазним блоком. На зрізи нанесли моноклональні антитіла до епітопу людини синдекану-1 CD 138+ та шляхом проведення мікроскопічних досліджень препаратів візуалізували первинні антитіла. Далі дофарбували зрізи гематоксиліном й еозином, уклали в напівсинтетичні середовища, покрили покривними стеклами. Шляхом світлової мікроскопії візуалізували в зрізах ендометрія хворой К. В зразках ендометрія були виявлені плазматичні клітини, імунопозитивні до епітопу людини синдекану-1 CD138+. За способом, що заявляється, встановлено діагноз ХЕ. Пацієнтці К. проведено необхідне протизапальне лікування. Проведена наступна спроба ЕКЗ була вдалою. Жінка завагітніла та народила здорову дитину.

Приклад 2. Пацієнтка О., 24 років, звернулася до гінеколога зі скаргами на безпліддя протягом 4 років. Менструації з 13 років, регулярні, по 6 днів через 28, безболісні, помірні. В анамнезі 2 позаматкові вагітності, у зв'язку з чим видалені маткові труби. Урогенітальних інфекцій не було. У чоловіка нормоспермія. Проведено невдалу спробу ЕКЗ.

В клініці хвора О., з підозрою на ХЕ, була обстежена для діагностики ХЕ за відомим способом-аналогом. На 21 -й день МЦ проведена гістероскопія, під час якої встановлено, що слизова обо-

лонка матки відповідає стадії секреції, патологічних утворень не виявлено. Виконана біопсія ендометрія. Зразки ендометрія досліджували за прикладом 1. В ендометрії при мікроскопії виявлено поодинокі лейкоцити, вогнищеві стромальні інфільтрати з лімфоцитів і лейкоцитів навколо залоз, а також зростання стромальної щільності. Плазматичні клітини не реєстрували, тому діагноз ХЕ у хворой О. відхилено.

Для уточнення діагнозу хворій О. провели додаткове імуногістохімічне дослідження зразків ендометрія за способом, що заявляється. В зразках ендометрія не були виявлені клітини, імунопозитивні до епітопу людини синдекану-1 CD138+, тобто в лімфоцитарних інфільтратах були відсутні плазматичні клітини.

Діагноз ХЕ після проведення імуногістохімічного дослідження не підтверджено. Виявлені в зразках ендометрія лімфоцитарні інфільтрати розцінені як прояв порушень імунної реактивності ендометрія. Пацієнтці проведено необхідне лікування гормональними препаратами та імуномодуляторами. Проведена наступна спроба ЕКЗ була вдалою. Жінка завагітніла та народила здорову дитину.

Приклад 3. Пацієнтка М., 31 рік, звернулася до гінеколога зі скаргами на безпліддя впродовж 12 років. Менструації з 14 років, по 5 днів через 28, безболісні, помірні. МЦ регулярний, овуляторний. В анамнезі 1 мимовільний аборт. Проліковані бактеріальний вагіноз, уреоплазмоз. Маткові труби за даними метросальпінгографії прохідні. У чоловіка - нормоспермія.

В клініці хвора М. з підозрою на ХЕ була обстежена для діагностики ХЕ за відомим способом-аналогом. Їй була проведена гістероскопія, під час якої встановлено, що слизова оболонка матки відповідає стадії секреції, патологічних утворень не виявлено. Виконали біопсію ендометрія. Зразки ендометрія досліджували за прикладом 1. В ендометрії при мікроскопії виявлено секреторні зміни відповідно середньої фази секреції, поодинокі лейкоцити навколо судин і залоз. Плазматичні клітини не реєстрували, тому діагноз ХЕ у хворой М. відхилено.

Для уточнення діагнозу хворій М. провели додаткове імуногістохімічне дослідження зразків ендометрія за способом, що заявляється. В зразках ендометрія були виявлені клітини, імунопозитивні до епітопу людини синдекану-1 CD138+, встановлено діагноз ХЕ. Пацієнтці проведено необхідне протизапальне лікування. Жінка самостійно завагітніла, виносила та народила здорову дитину.

