

МЕЛКУМЯН
Арика Гагиковна

**ГЛУБОКИЙ ИНФИЛЬТРАТИВНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ:
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ
НАРУШЕНИЙ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент

Павлович Станислав Владиславович

доктор медицинских наук

Кречетова Любовь Валентиновна

Официальные оппоненты:

Доброхотова Юлия Эдуардовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Хамошина Марина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Минздрава России

Защита состоится «31» мая 2022 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/disser_mag.pdf?1130684101

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) – это хроническое, гормон-зависимое, многофакторное заболевание, характеризующееся наличием и функциональной активностью гетеротопических очагов вне полости матки, по биологическим свойствам подобной эутопическому эндометрию. Патофизиология эндометриоза, несмотря на значительное число исследований, до конца не изучена [Адамян Л.В и соавт., 2018; A.S. Laganà et al., 2019]. Распространенность эндометриоза варьирует от более чем у 10% женщин репродуктивного возраста в популяции до уровня более чем 20% у женщин при синдроме тазовой боли и до 50% при женском бесплодии. Высокий уровень популяционной заболеваемости, значительное число осложнений, в том числе бесплодия, обуславливают медицинскую и социальную значимость данного заболевания. Глубокий инфильтративный эндометриоз (ГИЭ) является особой формой заболевания с характерной выраженной тяжестью симптомов и дисфункцией соседних органов.

В исследованиях, проведенных в последние годы, значительное место занимает изучение роли иммунных факторов в формировании эндометриоидных очагов, их функционирования, распространения заболевания, а также взаимосвязей иммунных нарушений и клинических проявлений заболевания при разных формах и стадиях эндометриоза. Большое внимание уделяется микроокружению эндометриоидных гетеротопий, продуцирующих цитокины, хемокины и факторы роста, в том числе ангиогенные, оказывающие разнообразное влияние на патобиологию заболевания, а также на разнообразные свойства перитонеальной жидкости [Rižner T.L., 2015]. Перечисленные факторы способствуют развитию хронического субклинического воспаления, неоангиогенезу, разрастанию ткани, прорастанию нервных волокон в эндометриоидные очаги и другим гиперпролиферативным процессам, способствующим длительному автономному функционированию и развитию

заболевания, формированию тазовой боли [Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К., 2017; Андреева Е.Н., Шереметьева Е.В., 2021].

Эндометриоз ассоциируется с повышенным образованием аутоантител и имеет сходство с аутоиммунными заболеваниями [Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К., 2017]. Степень формирования аутоиммунных нарушений закономерно возрастает с тяжестью течения и наиболее выражена при распространенных формах заболевания [Greenbaum H. et al., 2021].

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время проводится поиск высокочувствительных и специфических биомаркеров для неинвазивной диагностики эндометриоза, мониторинга прогрессирования заболевания и эффективности лечения. По данным систематического обзора, из оцененных 97 биомаркеров крови только четыре, а именно антиэндометриальные антитела, IL-6, CA 19-9 и CA 125, были ассоциированы с эндометриозом, однако не обладали достаточной точностью [Nisenblat V. et al., Cochrane Database Syst Rev. 2017]. По результатам предшествующих исследований некоторые аутоантитела рассматриваются как возможные маркеры для неинвазивной диагностики эндометриоза [Nabeta M. et al, 2014; Gajbhiye R. et al, 2017], связаны с процессами миграции, инвазии, адгезии, пролиферации и апоптоза клеток, которые имеют важное значение в развитии эндометриоза. К иммунным нарушениям при эндометриозе относят снижение реакций клеточной цитотоксичности в отношении клеток аутологичного эндометрия и развитие аутоиммунных реакций. Для эндометриоза характерно развитие локального воспаления с системной субклинической манифестацией. Для более полного понимания патогенеза заболевания представляется важным изучение роли ангиогенных, нейрогенных факторов, цитокинов, хемокинов, различных ростовых факторов в формировании и прогрессировании очагов ГИЭ.

Цель исследования

Совершенствование комплексной диагностики глубокого инфильтративного эндометриоза на основании изучения аутоиммунных маркеров и определение роли иммунных факторов в патогенезе заболевания.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-anamнестические и лабораторные параметры при распространенных формах наружного генитального эндометриоза.
2. Изучить профиль аутоантител у женщин с глубоким инфильтративным эндометриозом.
3. Определить диагностическое значение аутоантител при разных формах распространенного наружного генитального эндометриоза.
4. Провести сравнительный анализ профиля секретируемых белков в эктопическом и эндометриозном эндометрии у женщин с глубоким инфильтративным эндометриозом.
5. Усовершенствовать алгоритм комплексной диагностики глубокого инфильтративного эндометриоза с учетом роли выявленных в исследовании аутоиммунных антител.

Научная новизна

Проведено изучение клинико-anamнестических данных и лабораторных параметров, в том числе аутоиммунных антител у пациентов с глубоким инфильтративным эндометриозом. Охарактеризован спектр аутоантител в сыворотке крови при глубоком инфильтративном эндометриозе. Установлено, что частота выявления различных антител класса G и M к эстрадиолу, тропомиозину 3 и хорионическому гонадотропину человека и их уровни характеризуется существенными изменениями при эндометриозе. Определена диагностическая значимость отдельных аутоантител и их сочетания при распространенных формах эндометриоза с поражением и без поражения яичника.

Впервые охарактеризован спектр белков в супернатантах клеток эктопического и эутопического эндометрия у пациентов при распространенных формах наружного генитального эндометриоза.

Установлены существенные различия в продукции цитокинов, хемокинов и факторов роста между эктопическим и эутопическим эндометрием при эндометриозе и эутопическим эндометрием у здоровых женщин.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлена значимость аутоиммунных параметров в диагностике глубокого инфильтративного эндометриоза.

Выявлен широкий спектр аутоантител разной специфичности у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Показано, что профиль антител у пациенток с распространенными формами наружного генитального эндометриоза характеризуется как более высокой частотой выявления, так и более высокими уровнями IgM-антител к прогестерону, эстрадиолу и хорионическому гонадотропину человека, чем у женщин без эндометриоза. Показаны различия в диагностической значимости ряда аутоиммунных маркеров при распространенных формах НГЭ с поражением и без поражения яичника, которые могут быть использованы в комплексной диагностике разных форм заболевания.

Установлены антитела, характеризующиеся высоким уровнем диагностической значимости для включения в панель биомаркеров для неинвазивной диагностики глубокого инфильтративного эндометриоза.

Положения, выносимые на защиту

1. Глубокий инфильтративный эндометриоз характеризуется длительностью течения, поздним установлением диагноза заболевания и высокой частотой рецидивирования. Клинические проявления заболевания характеризуются неспецифичностью симптомов. Наиболее значимыми клиническими проявлениями распространенных форм наружного генитального

эндометриоза являются: хроническая тазовая боль, диспареуния, бесплодие, аномальные маточные кровотечения.

2. Распространенные формы наружного генитального эндометриоза характеризуются повышенной выработкой аутоантител к эндометриальным антигенам, стероидным гормонам и хорионическому гонадотропину человека. У пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом отмечается как более высокая частота выявления, так и более высокий уровень IgM-антител к прогестерону, эстрадиолу и хорионическому гонадотропину человека, чем у женщин без эндометриоза. Высокую диагностическую значимость имеют IgM-антитела к тропомиозину, хорионическому гонадотропину человека и эстрадиолу, которая существенно повышается при определении комбинации этих антител.

3. Наружный генитальный эндометриоз характеризуется повышением активации клеток из эктопических очагов, продуцирующих цитокины различной функциональной направленности, хемокины и факторы роста, опосредующие различные аспекты клеточных взаимодействий, способствующие воспалительному процессу, ангиогенезу и пролиферации клеток. В эктопическом эндометрии при эндометриозе имеет место избирательное увеличение выработки фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-4, что указывает на преимущественную активацию гуморального звена иммунной системы и согласуется с полученными результатами повышенной продукции различных типов аутоантител.

Личный вклад автора

Автор проявил инициативу в выборе темы диссертационной работы, формулировке цели и обоснования задач исследования, формирования дизайна исследования. Автором самостоятельно проведены: аналитический обзор отечественной и иностранной англоязычной литературы, обсуждение и разработка программы и методов исследования, осуществлен сбор материала, формирование компьютерной базы данных, анализ, обработка полученных данных, статистический анализ и интерпретация полученных результатов

научного исследования. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практические рекомендации. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном выполнении каждого из этапов научного исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 3 и 4 области исследований паспорта специальности «акушерство и гинекология».

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается: количеством пациентов, включенных в исследование, использованием современных методов исследования, соответствующих цели и задачам. Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Апробация результатов исследования

Апробация диссертации была проведена на межклинической конференции (17.02.2022 г) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России 21.02.2022, протокол № 1.

Основные результаты исследования представлены на II Национальном Конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020), XXVI Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья: от менархе до менопаузы» (Москва, 2020), XIII

региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва - Казань, 2020), XXII Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 2021).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе хирургического отделения отдела оперативной гинекологии и общей хирургии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 4 - в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена в традиционной форме на 109 страницах компьютерного текста, состоит из оглавления, введения, обзора литературы, характеристики групп и методов исследования, глав по результатам собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа содержит 16 таблиц и иллюстрирована 8 рисунками. Библиографический указатель включает 159 источников литературы, в том числе 27 - на русском и 130 - на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России. В исследование были включены 130 женщин репродуктивного возраста (20-40 лет). В зависимости от дизайна задач исследования было сформировано 2 группы. В 1-ю группу включены 95 пациентов с глубоким инфильтративным эндометриозом. В группу контроля было включено 35 женщин репродуктивного возраста без эндометриоза. У 74 пациентов с РНГЭ и у 27

женщин контрольной группы проводилось исследование по определению аутоантител. У 21 пациента с РНГЭ и 8 пациентов без НГЭ было проведено изучение профиля секретируемых белков в культуре клеток *in vitro* из эутопического и эктопического эндометрия.

Диагноз эндометриоза устанавливался на предоперационном этапе, объективизировался при проведении оперативного лечения и был подтвержден при проведении морфологического исследования.

При первичном осмотре проводилось полное клиничко-anamнестическое обследование, с включением сбора анамнеза, общего и гинекологического осмотра, клиничко-лабораторное обследование, УЗИ органов малого таза.

Всем пациентам с эндометриозом было проведено оперативное лечение. Объем оперативного вмешательства зависел от степени распространения заболевания.

Эндоскопическая операция проводилась по стандартизированной методике с помощью эндовидеохирургического оборудования фирмы «Karl Storz» (Германия). Диагноз Э устанавливали при обнаружении эндометриоидных гетеротопий и последующей верификацией диагноза при гистологическом исследовании. Эндометриоидные очаги иссекались в пределах визуально здоровых тканей, во всех случаях проводилась гистероскопия и диагностическое выскабливание цервикального канала и полости матки с патоморфологическим исследованием операционного материала.

Сбор образцов периферической крови проводился перед проведением оперативного вмешательства. Образцы эутопического эндометрия и очагов эндометриоза помещали в стерильные пробирки и немедленно транспортировали в лабораторию. Образцы крови для проведения специальных методов исследования направлялись в лабораторию по сбору и хранению биоматериалов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и замораживались при -70°C , где осуществлялось их хранение до проведения исследования.

В исследование не включались пациенты с аутоиммунными заболеваниями; при наличии гемотрансфузий в анамнезе; при наличии заболеваний, являющихся противопоказанием для оперативного лечения.

Критериями исключения из исследования служили злокачественные новообразования, острые воспалительные заболевания органов малого таза, инфекционные заболевания.

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Пациенты, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие в настоящем исследовании.

Использовались специальные методы исследования: определение аутоантител в сыворотке периферической крови и исследование культур клеток эндометриального и эктопического эндометрия для определения содержания ряда цитокинов, хемокинов и факторов роста. Исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий - д.м.н. Кречетова Л.В.). Антитела к тропомиозину 3 (аТМЗ), тропомодулину 3 (аТМОД), синтаксину 5 (аСТ), α -енолазе (аЕН) определяли в сыворотке крови с помощью модификаций ИФА с использованием соответствующих рекомбинантных белков. Антитела к гормонам: хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ), прогестерону и эстрадиолу определяли по методике непрямого твердофазного ИФА. Определение антител классов М и G к кардиолипину (КЛ) и β 2-гликопротеину-1 (β 2-ГП-1) проводили с использованием иммуноферментных наборов производства ORGENTEC Diagnostika (Германия). Для определения IgG-антител к ламинину-1 в сыворотке крови больных использовали иммуноферментный набор IBL International (Германия).

Забор образцов эндометриального и эктопического эндометрия был осуществлён у 21 пациента с Э. Всем пациентам диагноз был подтвержден гистологически. У 8 пациенток, у которых в ходе оперативного вмешательства было подтверждено отсутствие Э, был осуществлён забор образцов эндометриального

эндометрия. В кондиционированной среде 2-го пассажа культур эктопического и аутопического эндометрия определяли содержание различных цитокинов, хемокинов и факторов роста (ИЛ-1 β , ИЛ-1ra, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12(p70), ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-17A, ИФН- γ , ФНО α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, CSF, ГМ-КСФ, PDGF-bb, RANTES, Eotaxin, СЭФР, FGF basic) мультиплексным методом с использованием стандартной 27-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Наибольшее количество пациенток во всех исследуемых группах находилось в возрастной категории 30-35 лет.

Анализ клинико-anamнестических данных выявил более частое наличие заболеваний желудочно-кишечного тракта и железодефицитной анемии у пациентов с эндометриозом, по сравнению с пациентами без эндометриоза. Анализ менструальной функции выявил значительно большую частоту нерегулярных маточных кровотечений и дисменореи у пациентов с эндометриозом по сравнению с пациентами контрольной группы. Анализ показателей репродуктивной функции свидетельствует о достоверно низком числе как первобеременных, так и повторобеременных женщин с РГЭ и более высоком показателе в группе контроля.

Данный анализ показал, что больше половины пациентов с ГИЭ обращалась за медицинской помощью как минимум спустя 2 года после клинической манифестации заболевания.

В целом, результаты анализа клинико-лабораторного обследования пациентов с глубоким инфильтративным эндометриозом указывают на неспецифичность симптомов. Глубокий инфильтративный эндометриоз характеризуется длительным течением заболевания. Клинические проявления заболевания характеризуются неспецифичностью симптомов. При этом тазовая

боль является наиболее значимым проявлением глубокого инфильтративного эндометриоза.

У пациентов с эндометриозом был выявлен широкий спектр сывороточных аутоантител разной специфичности (табл. 1), включающий: антитела к гормонам (эстрадиолу (Э), прогестерону (ПГ), хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ)), к специфическим эндометриальным антигенам (тропомииозину 3 (ТМЗ), тропомодулину 3 (ТМОД)), гликолитическому ферменту α -енолазе (ЕН) и антифосфолипидные антитела (аФЛ).

Таблица 1. Распространенность аутоантител у пациентов с НГЭ (абс. ч., %).

Параметры	Группа ГИЭ(n=74)	Группа контроля (n= 27)	P ₁ -уровень	ОШ, 95% ДИ	P ₂ -уровень
аПГ	25 (33,8%)	3 (11,1%)	0,025	4,1[1,12-14,9]	0,033
аЭ	37 (50%)	3 (11,1%)	0,0004	8,0[2,22-28,9]	0,002
аХГЧ	21 (28,4%)	2 (7,4%)	0,027	4,95[1,08-22,8]	0,04
аЕН	32 (43,2%)	5 (18,5%)	0,023	2,7[0,93-7,86]	0,07
аТМОД	29 (39,2%)	4 (14,8%)	0,021	3,7[1,16-11,82]	0,027
аТМЗ	27 (36,5%)	3 (11,1%)	0,014	4,6[1,26-16,7]	0,021
аФЛ	8 (10,8%)	0	0,077	7,0[0,39-126,1]	0,19

Примечание: P₁ – уровень значимости различий между показателями частоты в двух группах; отношение шансов (ОШ), 95%-ный доверительный интервал (ДИ) и уровень значимости (P₂).

Статистически значимо чаще у пациентов с эндометриозом обнаруживались антитела к прогестерону, эстрогенам, ХГЧ, эндометриальным антигенам (ТМОД, ТМЗ) и α -енолазе. В группе с РГЭ отмечалась наиболее высокая вероятность образования антител к эстрадиолу, ХГЧ, ТМЗ и прогестерону (ОШ>4,0; P<0,05). Антифосфолипидные антитела классов М и G суммарно были выявлены у 11 пациентов: IgM-антитела к КЛ, β 2-ГП-1 и ФС - у 2 (2,7%) пациентов, IgM- и IgG-антитела к Ан V и ПТ – у 1 (1,4%) пациента антитела каждого вида, IgG к компоненту комплемента C1q – у 3 (4,1%) пациентов. Хотя в группе сравнения ни у одной из женщин аФЛ не были найдены, различия между двумя группами по частоте обнаружения аФЛ не были статистически значимыми.

У пациентов с эндометриозом значительно чаще, чем у женщин группы контроля, выявлялись IgM- и IgG-антитела к эстрадиолу и ХГЧ, IgM-антитела к ПГ, IgG-антитела к ТМЗ, ТМОД и α -енолазе ($P < 0,05$). Риск образования IgM-антител к эстрадиолу и прогестерону в группе эндометриоза был выше в 16,8 и 11 раз, соответственно, чем в группе сравнения. При этом значимых различий в частоте выявления IgM-антител к α -енолазе, ТМЗ, ТМОД и IgG-антител к ПГ не было обнаружено.

По данным ROC-анализа, IgM-антитела к ТМЗ, эстрадиолу, прогестерону и ХГЧ имели высокую диагностическую значимость для эндометриоза, их определение характеризовалось высокими значениями площади под кривой, чувствительности и специфичности (рис.1).

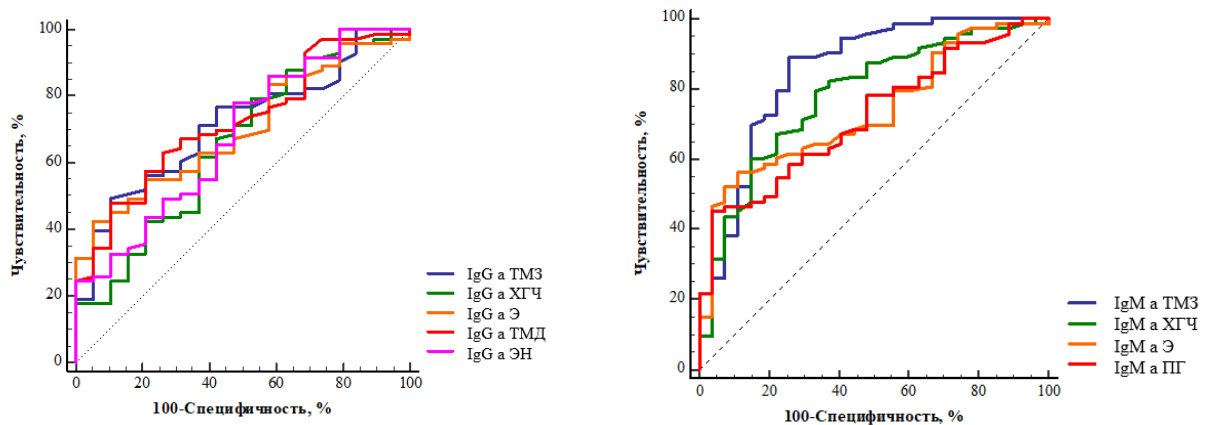


Рис. 1. ROC-кривые вероятности наличия ГИЭ у женщин в зависимости от уровня аутоантител класса G (А) и класса М (Б) в сыворотке крови.

По данным множественного логистического регрессионного анализа, определение комбинаций антител характеризовалось высокой диагностической значимостью для распространенных форм НГЭ, при этом показатели АUC достигали 0,800 - 0,843, а диагностическая точность анализа составляла 80-84,8% (табл. 2).

Таблица 2. Диагностическая значимость определения комбинаций аутоантител при распространенных формах наружного генитального эндометриоза

Вид антител	AUC, 95% ДИ	Диагностическая точность %	Значение P
аТМЗ IgM + а ХГЧ IgM	0,843[0,757-0,908]	81	<0,0001
аЭ IgG + а ТМЗ IgM	0,800[0,704-0,876]	84,8	0,0002
а Э IgM +аТМЗ IgM	0,835 [0, 748-0,902]	80	<0,0001

В таблице 3 представлены данные о диагностической значимости аутоантител для ГИЭ с поражением яичников. Полученные данные указывают на высокую диагностическую значимость IgM-антител к ТМОД, Э и ХГЧ, а также IgG-антител к Э для НГЭ с поражением яичников, их определение характеризовалось высокими значениями площади под кривой (AUC 0,717 - 0,848; $p < 0,001$).

По данным множественного логистического регрессионного анализа, определение комбинации аутоантител, включающей IgM-антитела к ТМЗ и ХГЧ, а также IgG-антитела к α -енолазе, существенно повышало диагностическую значимость антител для пациентов с эндометриозом с поражением яичников, значение AUC достигало 0,875 [0,772-0,978] ($p < 0,0001$), показатель диагностической точности составлял 83,3%.

Анализ данных о диагностической значимости аутоантител для эндометриоза без поражения яичников показал высокий уровень диагностической значимости IgM-антител к ТМЗ и ХГЧ, их определение характеризовалось высокими значениями площади под кривой (AUC 0,736 и 0,844; $p < 0,001$), (табл.4, рис. 3.).

Проведенный анализ позволил эффективно дифференцировать пациентов с НГЭ и поражением яичников и женщин группы сравнения по уровню IgM-антител

к ТМЗ, Э, ХГЧ и IgG-антител к Э, при этом предсказательная способность модели оценивалась как хорошая (рис. 2).

Таблица 3. Диагностическая значимость определения аутоантител при распространенных формах наружного генитального эндометриоза с поражением яичника

Вид антител	CV, Ед. ОП	Se, %	Sp, %	AUC, 95% ДИ	Значение P
аЭН IgG	>0,215	77,4	52,6	0,692[0,572;0,796]	0,006
аТМОД IgG	>0,224	71,7	59,3	0,677[0,563;0,777]	0,0059
аТМЗ IgM	>0,18	88,7	74,1	0,848[0,75-0,918]	0,0001
аХГЧ IgG	>0,229	67,9	51,9	0,659[0,544-0,761]	0,0165
аХГЧ IgM	>0,199	71,7	77,8	0,798[0,693-0,879]	<0,001
аЭ IgG	>0,266	71,7	59,3	0,717[0,605-0,812]	0,0003
аЭ IgM	>0,232	71,7	59,3	0,769[0,661-0,856]	<0,0001

Примечание: CV- значение критерия, значения чувствительности (Se), специфичности (Sp), площади под ROC-кривой (AUC) с 95%-ым доверительным интервалом; P – уровень значимости.

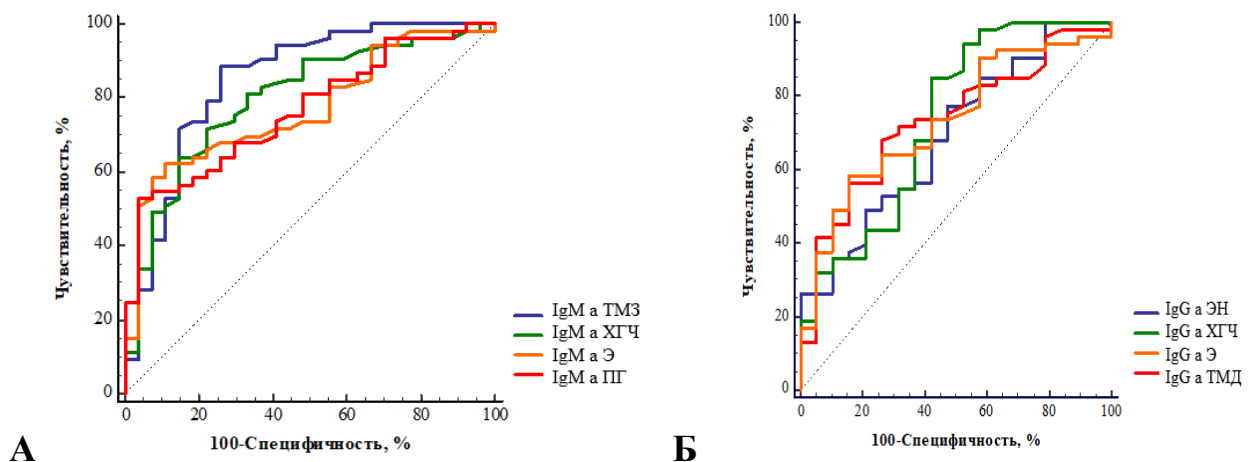


Рис. 2. ROC-кривые вероятности наличия наружного генитального эндометриоза с поражением яичников у женщин в зависимости от уровня аутоантител класса М (А) и класса G (Б) в сыворотке крови

Таблица 4. Диагностическая значимость определения аутоантител при глубоком инфильтративном эндометриозе без поражения яичников

Вид антител	CV, Ед. ОП	Se, %	Sp, %	AUC, 95% ДИ	Значение P
аТМЗ IgM	>0,18	90	74,1	0,844[0,708-0,933]	<0,0001
аХГЧ IgM	>0,18	80	63,0	0,736[0,587-0,854]	0,0013

Примечание: CV- значение критерия, значения чувствительности (Se), специфичности (Sp), площади под ROC-кривой (AUC) с 95%-ым доверительным интервалом; P – уровень значимости.

Проведенный анализ (рис. 3) позволил эффективно дифференцировать пациентов без поражения яичников и женщин группы контроля по уровню IgM-антител к ТМЗ и ХГЧ, при этом предсказательная способность модели оценивалась как хорошая (AUC более 0,7).

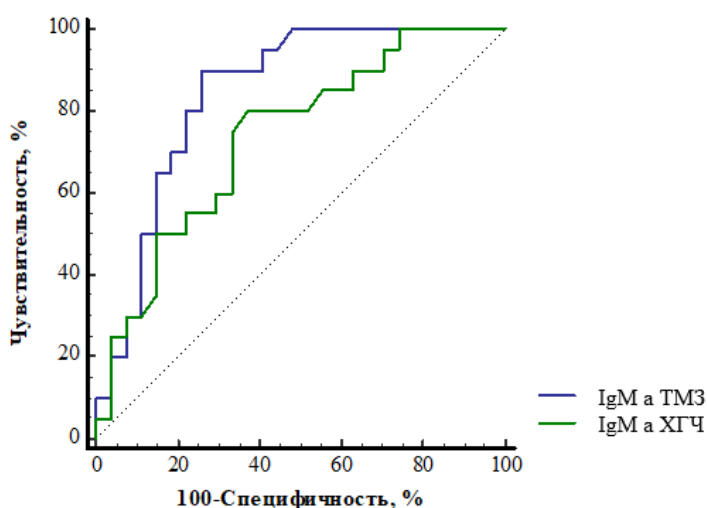


Рис. 3. ROC-кривые вероятности наличия ГИЭ эндометриоза без поражения яичников у женщин в зависимости от уровня аутоантител в сыворотке крови.

Обращает на себя внимание, что IgM-антитела к ТМЗ и ХГЧ имеют высокое диагностическое значение при обеих формах заболевания, как с поражением

яичников, так и без него. При определении комбинации данных аутоантител для диагностики эндометриоза без поражения яичников значение AUC составило 0,835 (95% ДИ [0,698-0,927]; $P=0,007$), диагностическая точность – 70,2%.

Для сравнительной оценки профиля секретируемых белков клетками из эутопического эндометрия и эндометриоидных очагов пациентов с распространенными формами НГЭ изучались парные образцы эутопического и эндометрия и эктопических эндометриоидных очагов. У пациентов из группы сравнения были взяты только образцы эутопического эндометрия, интраоперационно в этой группе было подтверждено отсутствие очагов Э.

Фенотипическая характеристика клеточного состава культивируемых клеток, которые были выделены из эктопических эндометриоидных очагов, значительно отличалась от характеристики клеток эутопического эндометрия как у тех же пациентов, так и в группе сравнения. Анализ данных указывает на принадлежность исследованных клеток преимущественно к популяции мезенхимальных стромальных клеток.

Результаты анализа профиля изученных белков в супернатантах клеток эутопического эндометрия пациентов с НГЭ по сравнению с профилем белков в супернатантах клеток эндометрия пациентов контрольной группы представлены на рис. 4.

Концентрация факторов роста и хемокинов в супернатантах культур клеток эутопического эндометрия и клеток контрольного эндометрия не отличались. При исследовании уровня цитокинов обнаружена увеличенная продукция клетками эутопического эндометрия ФНО- α (Me 102, 38-206 и Me 36, 29-71, соответственно, $p=0,042$) и ИЛ-4 (Me 6,9, 3,5-12,9 и Me 2,9, 2,7-5,0, соответственно, $p=0,033$).

Результаты анализа профиля растворимых белков в супернатантах культур клеток из очагов эндометриоза пациентов с НГЭ по сравнению с их профилем в супернатантах клеток контрольного эндометрия представлены на рис. 5.

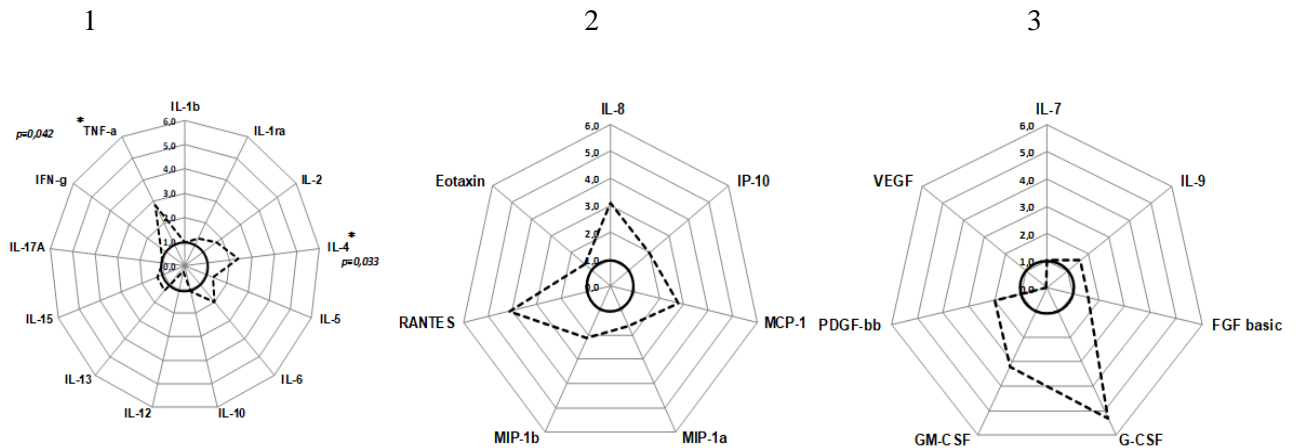


Рис 4. Сравнительная характеристика профиля цитокинов (1), хемокинов (2) и ростовых факторов (3), продуцированных *in vitro* клетками эутопического эндометрия при наружном генитальном эндометриозе. Данные на диаграммах, отложенные по осям, представлены как отношение медианы концентрации конкретного белка в супернатантах клеток эутопического эндометрия пациентов с НГЭ к концентрации в супернатантах клеток эндометрия пациентов контрольной группы. Сплошной линией показан уровень равенства значений.

* - показатели, достоверно отличающиеся от контрольных значений.

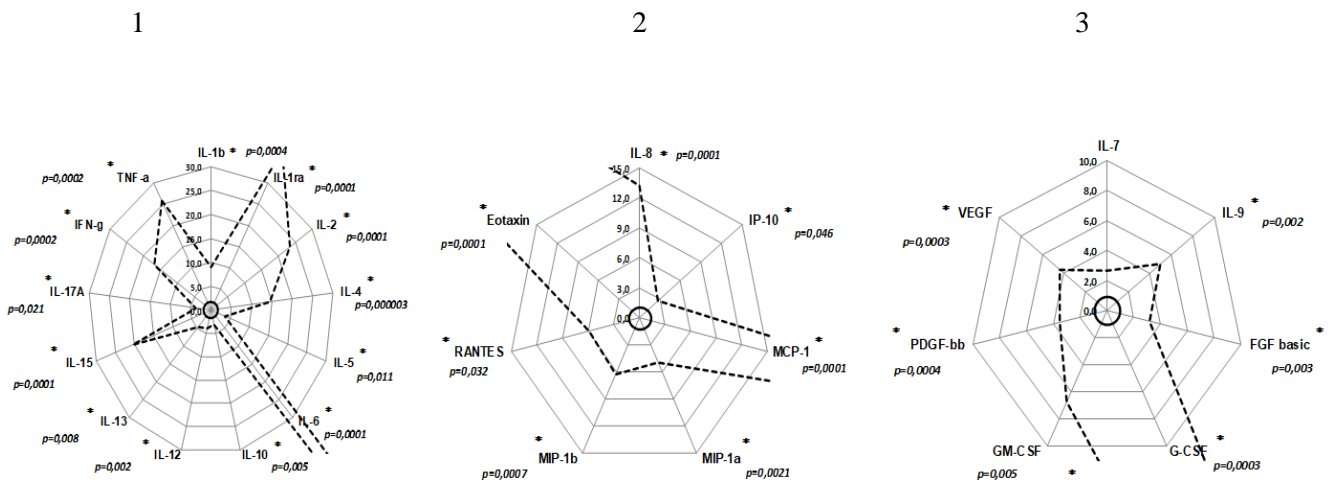


Рис 5. Сравнительная характеристика профиля цитокинов (1), хемокинов (2) и ростовых факторов (3), продуцированных *in vitro* клетками эктопического эндометрия пациентов с наружным генитальным эндометриозом и контрольного эндометрия. * - Показатели, достоверно отличающиеся от контрольных значений.

В супернатантах культур клеток из очагов эндометриоза концентрация всех исследованных белков значительно превышает контрольные значения, при этом концентрация ИЛ-6 была выше в 213 раз, эотаксина - в 65 раз, хемокина MCP-1- в 50 раз, фактора роста G-CSF – в 66 раз.

Сравнительный анализ концентрации исследованных белков в супернатантах культур клеток из эндометриоидных гетеротопий и эутопического эндометрия пациентов с НГЭ представлен на рис.6.

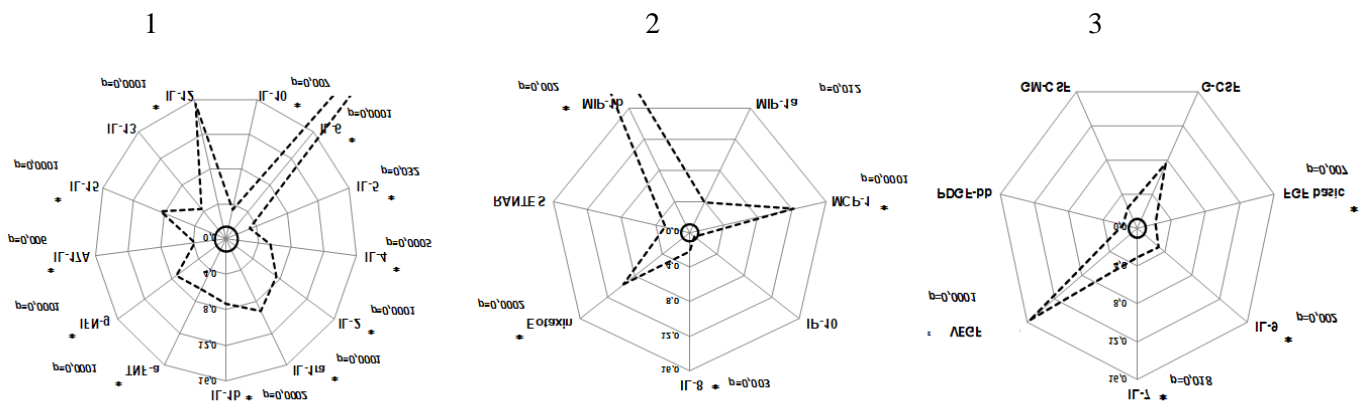


Рис.6. Сравнительная характеристика профиля цитокинов (1), хемокинов (2) и ростовых факторов (3) при ГИЭ, продуцированных *in vitro* клетками из очагов эндометриоза и эутопического эндометрия.

* - Показатели, достоверно отличающиеся от контрольных значений.

Концентрация исследованных цитокинов была существенно выше в супернатантах культур клеток из эндометриоидных гетеротопий (ИЛ-6 – в 42,3 раза). Концентрация хемокинов также была выше (MIP-1b - в 36 раз), но отсутствовали различия в концентрации IP-10 и RANTES. Также существенно выше была концентрация ряда факторов роста, в частности СЭФР, но отсутствовали различия в концентрации G-CSF, ГМ-КСФ, PDGF-bb. Эндометриоз ассоциируется с нарушением экспрессии многих растворимых факторов: молекул адгезии, ростовых факторов, цитокинов, матриксных металлопротеиназ и ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов [Borrelli G.M. et al. 2014]. В

систематическом обзоре 2014 г. указывается, что по заключениям ряда исследований хемокины и их рецепторы предлагается рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров эндометриоза, особенно ИЛ-8, MCP-1, CCL-2, RANTES или CCL5 [Borrelli G.M. et al., 2014]. Поскольку известно, что уровень ИЛ-8 увеличивается при любых воспалительных процессах, то данный маркер скорее является биомаркером воспалительного процесса, что подтверждает роль воспаления в патогенезе эндометриоза.

Анализ содержания ряда (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО и СЭФР-А) цитокинов в перитонеальной жидкости пациентов с эндометриозом выявил ассоциацию с наличием эндометриоза повышенного уровня ИЛ-6 и ИЛ-8 [Barcz E. et al., 2012], повышенного уровня ИЛ-6, ИЛ-18, эотаксина и MCP-1 независимо от фазы менструального цикла [Bersinger N.A. et al., 2012], повышенного уровня ИЛ-6 и ТФР- β , но без различий с контролем в содержании ИЛ-10 и ИЛ-17.

Таким образом, результаты исследования продукции *in vitro* широкого спектра белков, характеризующих функциональное состояние стромальных клеток, выделенных из эутопического эндометрия и эктопических очагов эндометриоза, указывают на состояние повышенной активации клеток из эктопических очагов, продуцирующих в культуральную среду цитокины различной функциональной направленности, хемокины и ростовые факторы и свидетельствуют о существенном вкладе в патогенез эндометриоза факторов, опосредующих разные аспекты клеточных взаимодействий, способствующих воспалительному процессу, ангиогенезу и пролиферации клеток.

Описанный механизм интенсивного воспалительного процесса при глубоком инфильтративном эндометриозе позволяет сформулировать гипотезу об активации аутоиммунного процесса при этой патологии. Формирование клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела к специфическим антигенам требует образования в тимусе Т-лимфоцитов с хелперной функцией из наивных клеток, активированных теми специфическими эпитопами антигенов, на которые будут формироваться клоны В-лимфоцитов. Поскольку тимический отбор направлен на исключение аутоантиген-специфичных Т-лимфоцитов, то это является причиной

невозможности развития аутоантительного В-клеточного ответа. Однако наличие такого естественного механизма не исключает возможности стимуляции появления при интенсивных воспалительных процессах аутоспецифических В-клеток за счет цитокинового фона, порождаемого ответом на длительную стимуляцию чужеродными антигенами. Результаты проведенного нами сравнительного исследования продукции цитокинов *in vitro* клетками из аутологичного эндометрия и эндометриоидных гетеротопий подтверждают правомочность данного обобщения, поскольку указывают на интенсивную продукцию цитокинов эктопическими клетками. В результате интенсивный рост эндометриальных клеток за пределами их естественной локализации, сопровождающийся нарушениями нормального функционирования инвазируемых тканей, способствует формированию цитокинового фона, необходимого для активации специфических В-лимфоцитов в прилежащих периферических лимфоидных органах (узлах).

Отсутствие костимуляции В-лимфоцитов со стороны Т-хелперов, поддерживающих формирование аутоспецифичных В-лимфоцитов, определяет временный, преходящий период продуцирования аутоантител активированным В-клеточным клоном. В связи с этим уровень аутоантител, выявляемых при распространенных формах НГЭ, не является достаточным для формирования клинических проявлений аутоиммунного заболевания, но сам факт их выявления у пациентов с эндометриозом может отражать распространенный характер процесса, активное течение заболевания и выраженность клинической симптоматики.

ВЫВОДЫ

1. Глубокий инфильтративный эндометриоз характеризуется длительным течением заболевания и высокой частотой рецидивирования. Клинические проявления заболевания характеризуются неспецифичностью симптомов. При

этом тазовая боль является наиболее значимым проявлением глубокого инфилтративного эндометриоза.

2. У пациенток с глубоким инфилтративным эндометриозом отмечается более высокая частота выявления и более высокий уровень аутоантител (M, G) к Э, ПГ, ХГЧ, ТПМ, ТМОД и ЕНО (28,4–50%) по сравнению с женщинами без эндометриоза.

3. Наибольшей диагностической значимостью при диагностике глубокого инфилтративного эндометриоза обладают IgM-антитела к тропомиозину-3, ХГЧ и эстрадиолу. Диагностическая значимость существенно повышается при определении комбинации указанных антител.

4. Пациенты с глубоким инфилтративным эндометриозом с поражением яичника характеризуются значимо более высокими уровнями IgG-антител к прогестерону, эстрадиолу и тропомодулину по сравнению с пациентами с распространенным наружным генитальным эндометриозом без поражения яичников.

5. Наружный генитальный эндометриоз характеризуется повышением активации клеток из эктопических очагов, продуцирующих цитокины, хемокины и факторы роста, опосредующие разные аспекты клеточных взаимодействий, способствующих воспалительному процессу, ангиогенезу и клеточной пролиферации. Максимальные различия концентрации в супернатантах культур клеток из очагов эндометриоза по сравнению с контролем выявлены для ИЛ-6 (в 213 раз), хемокина эотаксина (в 65 раз), хемокина MCP-1 (а) (в 50 раз), ростового фактора G-CSF (в 66 раз).

6. Эктопический эндометрий у пациентов при глубоком инфилтративном эндометриозе по сравнению с эндометрием у женщин без эндометриоза характеризуется избирательным увеличением выработки фактора некроза опухоли- α и ИЛ-4.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для своевременной диагностики глубокого инфильтративного эндометриоза у пациентов с синдромом тазовой боли, диспареунией, нарушениями менструального цикла и бесплодием показано проведение комплексного обследования с использованием визуализирующих методов обследования и колоноскопии.
2. При проведении комплексной диагностики распространенных форм наружного генитального эндометриоза рекомендуется определение комбинации аутоантител (IgM к тропомиозину 3 и ХГЧ; IgM к тропомиозину 3 и эстрадиолу; IgM к тропомиозину 3 и IgG к эстрадиолу) в периферической крови.
3. При обследовании и ведении пациентов с глубоким инфильтративным эндометриозом без поражения яичников рекомендуется определение аутоантител: IgM-антител к тропомиозину 3 и ХГЧ в связи с их высокой диагностической значимостью при этой форме заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. И.В. Менжинская, **А.Г. Мелкумян**, С.В. Павлович, В.Д. Чупрынин, Л.В. Кречетова. Распространенность и значение аутоантител для неинвазивной диагностики наружного генитального эндометриоза у женщин // **Акушерство и гинекология**. – 2022. – № 3. – С. 59-67.
2. С.В. Павлович, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, **А.Г. Мелкумян**, М.Н. Юшина, А.М. Савилова, З.Н. Макиян, Е.Л. Яроцкая, Е.Г. Хилькевич, В.Д. Чупрынин, Г.Т. Сухих. Особенности профиля секретируемых белков клетками из эндометриоидных очагов и эутопического эндометрия женщин с наружным генитальным эндометриозом в культуре *in vitro*. // **Акушерство и гинекология**. - 2019.-Т.8.- С.90-99.

3. С.В. Павлович, М.В. Юрова, **Мелкумян А.Г.**, В.Е. Франкевич, В.В. Чаговец, Г.Н. Хабас. Биомаркеры при новообразованиях яичников: возможности, ограничения и перспективы применения у женщин репродуктивного возраста. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. - Т.11. - С.65-73.
4. О.О. Кабанова, **А.Г. Мелкумян**, Л.В. Кречетова, И.В. Менжинская, С.В. Павлович. Роль иммунной системы в патогенезе эндометриоза. // **Гинекология.** - 2021. – Т. 6. - С. 485-493.
5. И.В. Менжинская, **А.Г. Мелкумян**, С.В. Павлович. Значение аутоантител в диагностике наружного генитального эндометриоза. // Тезисы II национального конгресса с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (ЛАБРИН-2020). – Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение – 2020. – Том 8, №1. – С. 99.
6. **А.Г. Мелкумян**, И.В. Менжинская, С.В. Павлович. Роль аутоантител при распространенном наружном генитальном эндометриозе. // Тезисы конгресса «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы». – Акушерство и гинекология. – 2020. - №4 (приложение). – С. 144-146.

Приложение 1

Алгоритм обследования пациентов с глубоким инфильтративным эндометриозом с включением аутоантител к стероидным гормонам, ХГЧ, специфическим эндометриальным антигенам и гликолитическому ферменту α -енолазе.

