

На правах рукописи

ЦИЦКАРАВА

Дмитрий Зурикович

**ГЛУБОКИЙ ИНФИЛЬТРАТИВНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ:
ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА И КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор РАН **Ярмолинская Мария Игоревна**

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор **Сельков Сергей Алексеевич**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
ГБУЗ МО "Московский областной
научно-исследовательский институт
акушерства и гинекологии",
руководитель отделения
эндоскопической хирургии **Попов Александр Анатольевич**

доктор медицинских наук, профессор
ФГБОУ ВО "Санкт-петербургский
государственный педиатрический
медицинский университет" МЗ РФ,
профессор кафедры акушерства и
гинекологии с курсом гинекологии
детского возраста **Гайдуков Сергей Николаевич**

Ведущая организация: ФГБВОУ ВО "Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова" Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится "_____" _____ 2018 г. в _____ ч на заседании диссертационного совета Д 001.021.01 при ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" (199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, дом 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" и на сайте: <http://ott.ru/all-news/dissert/zawita-dissertacii-sickarava-dmitrij-zurikoevich/>

Автореферат разослан "_____" _____ 2018 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**
доктор медицинских наук

Кузьминых Татьяна Ульяновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) занимает одно из ведущих мест в структуре гинекологических заболеваний.

На сегодняшний день существуют различные теории возникновения эндометриоза. Одной из наиболее обоснованных теорий является эпигенетическая, которая объединила иммунологическую, гормональную и генетическую теории происхождения данной патологии. (Айламазян Э.К., Баранов В.С., 2013). На основании изучения патогенеза эндометриоза известно о системных и локальных нарушениях процессов пролиферации, регуляции апоптоза и неоангиогенеза, протекающих на фоне хронического эстроген-зависимого воспаления. В настоящее время выделяют 4 различные формы эндометриоза: аденомиоз, поверхностный и глубокий инфильтративный эндометриоз, а также эндометриоидные кисты яичников (Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К., 2017).

Основными клиническими проявлениями заболевания являются болевой синдром, который отмечается у 15-80% больных (Kennedy S. et al., 2005), бесплодие, встречающиеся у 30-50%, а также самопроизвольное прерывание беременности у 10-30% пациенток (Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К., 2017).

Отмечено, что в структуре больных НГЭ неуклонно возрастает число больных с глубоким инфильтративным эндометриозом (ГИЭ), а также его рецидивов. ГИЭ характеризуется инвазивным прогрессирующим ростом с вовлечением в патологический процесс смежных органов, сопровождающимся выраженным болевым синдромом, оказывающим негативное влияние на качество жизни больных, что обуславливает необходимость углубленного изучения патогенеза заболевания и разработку новых эффективных схем терапии.

В современной литературе представлены результаты многочисленных исследований, продемонстрировавшие ведущую роль иммунной системы и многообразие ее нарушений в развитии НГЭ в целом и глубокого инфильтративного эндометриоза в частности (Guidice L.C., 2012). Учитывая агрессивный рост эндометриоидных инфильтратов, необходимо изучение роли цитокинов, в том числе про- и противовоспалительных интерлейкинов, факторов

роста, хемокинов в патогенезе ГИЭ как на системном, так и на локальном уровнях для поиска новых маркеров диагностики заболевания и разработки методов патогенетически обоснованной иммуномодулирующей терапии.

Целью исследования явилось изучение роли цитокинов и цитотоксических клеток в механизмах развития глубокого инфильтративного эндометриоза и разработка патогенетической иммуномодулирующей терапии.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать особенности клинического течения ГИЭ.
2. Оценить содержание НК-клеток, в том числе их активированных форм, в периферической крови у больных с ГИЭ.
3. Определить уровень про- и противовоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-33, факторов роста соединительной ткани FGF и TGF- β , а также хемокинов MCP-1 и IP-10 в перитонеальной жидкости у больных с ГИЭ.
4. Разработать показания к назначению и определить критерии эффективности цитокинотерапии в комбинированном лечении у больных с ГИЭ.
5. Оценить клиническую эффективность и иммуномодулирующее влияние комбинированного лечения с применением рекомбинантного ИЛ-2 у больных ГИЭ.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые определена роль провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-6) и противовоспалительных (ИЛ-10) интерлейкинов, хемокинов (MCP-1, IP-10), а также факторов роста (FGF, TGF- β) в патогенезе ГИЭ. У больных с ГИЭ впервые определён уровень ИЛ-33 в перитонеальной жидкости, который играет важную роль в регуляции гуморального и клеточного иммунного ответа.

Впервые установлена взаимосвязь между уровнем ИЛ-6 и ИЛ-33 в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ и степенью выраженности болевого синдрома. Оценена зависимость степени распространенности и частоты рецидивов ГИЭ от сниженного уровня ИЛ-2. Впервые доказано положительное влияние цитокинотерапии с применением рекомбинантного ИЛ-2 на клинические и лабораторные показатели у больных с ГИЭ, что

подтверждается повышением цитотоксической активности НК-клеток и снижением интенсивности болевого синдрома.

Практическая значимость работы

Впервые предложена стандартизация комплексного обследования больных с глубоким инфильтративным эндометриозом с помощью объективных методов обследования, анализа иммунного статуса и субъективной оценки болевого синдрома с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ) боли МакГилла.

Разработаны критерии назначения иммуномодулирующей терапии на основании исследования цитокинового состава перитонеальной жидкости у больных с глубоким инфильтративным эндометриозом и оценки изменений содержания активированных форм НК-клеток в периферической крови. Впервые предложено использование коэффициента стимуляции НК-клеток, для возможного прогнозирования эффективности иммуномодулирующей терапии.

Доказана эффективность цитокинотерапии с применением человеческого рекомбинантного ИЛ-2 у больных с глубоким инфильтративным эндометриозом. Впервые предложена схема иммуномодулирующей терапии глубокого инфильтративного эндометриоза, включающая интраоперационное внутрибрюшное введение рекомбинантного интерлейкина-2 с последующими внутривенными инфузиями каждые 48 ч №3 в дозировке 500000 МЕ. Сочетание иммуномодулирующей терапии рекомбинантным ИЛ-2 и схемы гормональной терапии (аГнРГ или Диеногеста 2 мг) у больных с глубоким инфильтративным эндометриозом позволило повысить эффективность проводимой терапии в 2 раза, а также достоверно снизить число рецидивов заболевания по сравнению со стандартной схемой гормонотерапии.

Предложен новый протокол обследования больных с глубоким инфильтративным эндометриозом, включающий в себя данные анамнеза и предшествующей гормональной терапии, выраженность болевого синдрома, оцененного на основании ВАШ, интраоперационную картину при сочетанном применении классификаций R-AFS и ENZIAN SCORE, результаты гормонального обследования и предшествующей медикаментозной терапии, а также репродуктивные планы пациенток.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. ГИЭ характеризуется у подавляющего числа больных выраженным болевым синдромом и спаечным процессом, бесплодием, рецидивирующим и прогрессирующим характером течения заболевания, сочетанием с экстрагенитальными формами эндометриоза.

2. У больных с ГИЭ отмечается достоверное снижение уровня активированных НК-клеток в периферической крови, а также дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов в перитонеальной жидкости, приводящие к прогрессированию заболевания, болевому синдрому и рецидивам заболевания.

3. Для ГИЭ характерно снижение уровня регуляторного цитокина ИЛ-2 в перитонеальной жидкости, что обуславливает целесообразность применения цитокинотерапии с использованием рекомбинантного ИЛ-2, влияющего в том числе и на активацию НК-клеток.

4. Цитокинотерапия с использованием рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин) в комплексном лечении у больных с ГИЭ достоверно повышает эффективность проводимого лечения, снижает интенсивность болевого синдрома и увеличивает длительность безрецидивного периода.

Личный вклад автора в работу. Автором самостоятельно проведен подбор больных, включенных в исследование, и выполнено комплексное клиническое обследование: сбор анамнеза, объективный осмотр, ультразвуковое исследование, анализ лабораторных данных и их результатов. Автор участвовал в качестве ассистента в 352 операциях, 11 из них выполнено самостоятельно. Автор участвовал в экспериментальной части работы на базе лаборатории иммунологии, принимая непосредственное участие в сборе и оценки биоматериала методом ИФА. Автором самостоятельно осуществлялся четырехлетний послеоперационный мониторинг пациенток, получавших иммуномодулирующую терапию, систематизация, статистическая обработка и анализ полученных данных, сформулированы выводы и предложен комплекс мероприятий, повышающий эффективность диагностики и лечения больных с глубоким инфильтративным эндометриозом.

Апробация и внедрение результатов работы в практику. Апробация работы проведена на совместном заседании отделений оперативной гинекологии с операционным блоком, гинекологической эндокринологии и отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 10-й междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы урологии и гинекологии» (Санкт-Петербург 2016), 2-й всероссийской конференции «Современные проблемы гинекологии и репродуктивного здоровья» (Иваново 2016), 8-м международном научном конгрессе «Оперативная гинекология – новые технологии» (Санкт-Петербург 2016), на 17 всемирном конгрессе «The 17th World Congress of Gynecological Endocrinology» (Firenze, Italy 2016), на 13 всемирном конгрессе «The 13th World Congress of Endometriosis» (Vancouver, Canada 2017).

Полученные результаты внедрены в работу отделений оперативной гинекологии с операционным блоком и гинекологической эндокринологии Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, отделения гинекологии СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

По теме работы опубликованы 9 научных работ, в том числе 7 печатных работ – в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц и иллюстрирована 11 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, общей характеристики методов исследования и обследованных лиц, собственных результатов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический указатель содержит 169 источников, из которых 26 отечественных и 143 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на отделениях оперативной гинекологии с операционным блоком (руководитель отдела – д.м.н. Попов Э.Н.) и гинекологической эндокринологии (руководитель отдела – д.м.н., профессор РАН, Ярмолинская М.И.), иммунологическое обследование пациенток проводилось в отделе иммунологии и межклеточного взаимодействия (руководитель отдела з.д.н. РФ, д.м.н. профессор Сельков С.А.) ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Проведено обследование 170 женщин с сочетанием НГЭ III-IV стадий (по классификации R-AFS) и ГИЭ находившихся на лечении в период с 2013-2016 гг. Все пациентки были разделены на 5 групп в зависимости от вида медикаментозной терапии в послеоперационном периоде. В I группу вошли 40 пациенток, получавших в послеоперационном периоде агонисты гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ) в дозировке 3,75 мг в течении 6 месяцев; II группу составили 40 пациенток, получавших в послеоперационном периоде диеногест в дозе 2 мг в течении 6 месяцев; III группу составили 35 пациенток, получавших в послеоперационном периоде аГнРГ) в дозировке 3,75 мг в течении 6 месяцев в сочетании с иммуномодулирующей терапией рекомбинантным ИЛ-2; в IV группу вошли 35 пациенток, получавших в послеоперационном периоде диеногест в дозе 2 мг в течении 6 месяцев в сочетании с иммуномодулирующей терапией рекомбинантным ИЛ-2; V – контрольную группу – составили 20 пациенток у которых при проведении лапароскопии перед процедурой ЭКО не было выявлено гинекологической патологии. В качестве иммуномодулятора был выбран рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин®) в дозе 500000 МЕ/мл. Препарат первоначально вводился однократно интраперитонеально в полость малого таза после постановки диагноза глубокого инфилтративного эндометриоза, в дальнейшем применение препарата продолжалось в послеоперационном периоде в виде трехкратной внутривенной инфузии каждые 48 ч также в дозе 500000 МЕ/мл, которая разводилась в 400 мл 0,9% физиологического раствора натрия хлорида.

Длительность внутривенной инфузии составляла 3-4 ч, со средней скоростью 20 кап./мин.

Критерии включения в исследование: возраст 18-45 лет; верифицированный интраоперационно диагноз НГЭ, подтвержденный гистологическим исследованием; применение в качестве гормонотерапии агнРГ или диеногеста 2 мг в течении 6 месяцев.

Критериями исключения явились: миома матки; декомпенсация хронических соматических заболеваний; острые инфекционные заболевания или обострение их хронических форм.

Для оценки тяжести НГЭ и распространённости спаечного процесса была использована пересмотренная классификация американского общества фертильности R-AFS и классификация ENZIAN-score. Для оценки и объективизации данных о болевом синдроме на протяжении всего менструального цикла была применена визуально-аналоговая шкала (ВАШ) боли по МакГиллу.

Всем пациенткам проводился забор периферической крови и перитонеальной жидкости. В перитонеальной жидкости проводилось определение уровня ИЛ-33 с помощью иммуноферментного анализа (BD, USA). Методом проточной цитофлуориметрии в формате CBA (Cytometric bead array) с использованием проточного цитофлуориметра FaCSCanto II (BD, USA) и тест-систем (BD, USA) в перитонеальной жидкости определяли уровни ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, IP-10, MCP-1 и факторов роста – FGF, TGF- β ; в периферической крови определялся уровень субпопуляций лимфоцитов, а также NK-клеток и их активированных форм проточной цитофлуориметрии с использованием проточного цитофлуориметра FaCSCanto II (BD, USA). Статистическая обработка полученных данных выполнена на персональном компьютере при помощи пакета программ для статистической обработки данных Statistica for Windows 7.0. Были использованы методы параметрической и непараметрической статистики. Методы описательной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), ошибки среднего значения (m) – для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также для частоты встречаемости признаков с дискретными значениями. Определение достоверности различий между

качественными показателями сравниваемых групп с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат) с учетом поправки Йетса для сравнения частот бинарного признака в двух несвязанных группах парных сравнений. Для оценки различий значений количественных показателей в разных группах применялся t-критерий Стьюдента для независимых выборок (после проверки распределения признаков на соответствие закону нормального распределения по критерию Колмогорова-Смирнова) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты исследования

На основании классификации R-AFS НГЭ III степени отмечен у 31% больных, НГЭ IV степени – у 69% пациенток. Средний возраст больных с ГИЭ составил $29,7 \pm 1,3$ года (от 21,4 года до 45 лет). У всех больных были оценены особенности менструального цикла. Средний возраст наступления менархе у женщин с ГИЭ составил $12,2 \pm 1,8$ лет (минимальный – 10,1 лет, максимальный – 13,4 лет). Средняя продолжительность менструального цикла в среднем была $24,1 \pm 2,4$ дня (от 18 дней до 36 дней). Регулярный менструальный цикл отмечался у 81% пациенток.

Среди нарушений менструального цикла у женщин с ГИЭ ведущими были: гиперполименорея у 78% женщин и перименструальные кровянистые выделения у 85% больных. Опсоменорея была характерна для 7% пациенток. Одной из основных жалоб была альгодисменорея у 84% пациенток. Для оценки и объективизации данных о болевом синдроме на протяжении всего цикла была применена визуально-аналоговая шкала боли по МакГиллу. В группе больных с ГИЭ нами был применен интегральный показатель интенсивности болевого синдрома, рассчитанный по формуле:

$$\text{Интенсивность болевого синдрома у больных с ГИЭ} = \frac{B1 + B2 + B3}{3},$$

где B1 – боли при менструациях; B2 – боли вне менструации; B3 – боли при половой жизни

При использовании данного показателя были выделены три группы в зависимости от уровня болевого синдрома. В первую группу вошли пациентки с болевым синдромом низкой интенсивности от 2 до 4 баллов, что составило 16% от всех больных с глубоким инфильтративным эндометриозом, вторую группу составили женщины с болевым синдромом средней интенсивности от 5 до 7 баллов (55%), в третью группу вошли больные (23%) с болевым синдромом высокой интенсивности от 8 до 10 баллов.

Бесплодие отмечено у 75% больных с ГИЭ, при этом первичное бесплодие встречалось у 78% пациенток (длительность составила $6,5 \pm 1,7$ лет), доля вторичного бесплодия составила 22% (длительность $-4,5 \pm 0,9$ года).

Важно особо выделить группу пациенток из 22 пациенток с экстрагенитальным эндометриозом, в которую вошли больные с эндометриозом прямой кишки (14%), мочевого пузыря (7%), диафрагмы (2%), передней брюшной стенки (4%). У пациенток данной группы отмечались в 90% случаев кровянистые выделения различной интенсивности из пораженных эндометриозом органов в период менструаций. Всем пациенткам было произведено оперативное вмешательство лапароскопическим доступом. У 2 больных в связи с необходимостью резекции участка прямой кишки была выполнена конверсия доступа до мини-лапаротомии для наложения анастомоза «конец в конец», у большинства больных (85%) матка находилась в положении *retroflexio versio*, в 15% случаев матка располагалась в *anterflexio versio*. В 57% случаев наблюдалось сочетание глубокого инфильтративного эндометриоза и аденомиоза. Всем пациенткам при наличии маточных труб производилась хромогидротубация раствором индигокармина. У 87% больных определялась нормальная проходимость маточных труб, у 7% – нарушение проходимости с одной стороны, у 6% пациенток обе маточные трубы были непроходимы.

В 48% случаев отмечалось сочетание эндометриоидного инфильтрата и эндометриоидных кист левого яичника, средний диаметр кист составил 4,5 см (минимальный диаметр -2,9 см максимальный 12,1 см). У 38% пациенток наблюдалось сочетание эндометриоидного инфильтрата и эндометриоидной кисты правого яичника, средний размер кисты составил 3,9 см (минимальный –

2,9 см, максимальный – 12,7 см). Среди пациенток данной группы позадишеечные эндометриоидные инфильтраты, локализованные между задней поверхностью шейки матки и перешейка и передней поверхностью верхнеампулярного отдела прямой кишки, наблюдались в 63% случаев. Средний объем данных инфильтратов составил 11,4 см³ (максимальный 19,4 см³, минимальный 3,2 см³). Инфильтраты в области левой крестцовой-маточной связки наблюдались в 14% случаев, их средний объем был равен 3,8 см³, в области правой крестцово-маточной связки – 16%, со средним объемом 2,9 см³, двухстороннее поражение крестцово-маточных связок отмечено у 7% больных.

У большинства больных наблюдался выраженный спаечный процесс в малом тазу: спаечная болезнь I степени наблюдалась в 3% случаев, II степени – в 18% случаев, III степени – 21% случаев, IV степени – 42% случаев. Позадишеечные эндометриоидные инфильтраты удалялись методикой «shaving», с последующим гистологическим исследованием. У 2 больных в связи с прорастанием инфильтрата в полость малого таза была выполнена резекция участка прямой кишки, приглашенным общим хирургом с помощью циркулярных сшивающих аппаратов фирмы Ethicon 12 и 14 мм. При этом производилась конверсия доступа для наложения анастомоза конец в конец.

После выполнения основного хирургического приема и контроля гемостаза, всем пациенткам устанавливался противоспаечный барьер (Interceed – 75%, Intercoat – 21%, прочие – 4%).

Результаты обследования иммунной системы

у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом

У всех пациенток с диагнозом ГИЭ в периферической крови были определены уровни НК-клеток и их активированных форм.

Значение НК-клеток изучались у пациенток с ГИЭ в сочетании с НГЭ III и НГЭ IV степени, у больных с первичным поражением и рецидивом заболевания, а также у пациенток с болевым синдромом различной интенсивности. У пациенток с ГИЭ в целом (НГЭ III+НГЭ IV ст.) уровень НК-клеток в периферической крови составил $12,7 \pm 1,3\%$ и достоверно не отличался

от данного показателя в группе контроля ($13,1 \pm 1,2\%$). Абсолютное содержание клеток также не имело существенных различий ($0,228 \pm 0,01$ тыс./мкл и $0,235 \pm 0,03$ тыс./мкл)

У пациенток с рецидивом ГИЭ отмечено повышение уровня НК-клеток в периферической крови по сравнению с группой контроля в 1,1 раза ($14,9 \pm 1,1$ и $12,1 \pm 1,3\%$ соответственно; $p < 0,05$). Уровень НК-клеток с фенотипом CD3+CD16+CD56+ был снижен у пациенток с впервые выявленным ГИЭ и с рецидивом заболевания в 1,3 и 1,2 раза по сравнению с уровнем в контрольной группе ($6,0 \pm 0,02$ и $7,8 \pm 0,08\%$; $6,4 \pm 0,07$ и $7,8 \pm 0,08\%$ соответственно). При этом уровень НК-клеток с фенотипом CD3-CD16+CD56+CD107A у пациенток как с первичным поражением, так и с рецидивом заболевания, был снижен в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($1,3 \pm 0,1$ и $2,7 \pm 1,1\%$ и $1,4 \pm 0,3$ и $2,7 \pm 1,1\%$ соответственно).

Таблица 1 – Уровень НК-клеток в периферической крови у пациенток с первично выявленным ГИЭ и рецидивом

Показатель	Первичное поражение ГИЭ (N=42)	Рецидив ГИЭ (N=29)	Группа контроля (N=20)
НК (CD3-CD16+CD56+), %	$12,1 \pm 1,3$	$14,9 \pm 1,1$	$13,1 \pm 0,7$
НК (CD3-CD16+CD56+), тыс./мкл	$0,235 \pm 0,03$	$0,318 \pm 0,07$	$0,245 \pm 0,6$
НКТ (CD3+CD16+CD56+), %	$6,0 \pm 0,02$	$6,4 \pm 0,07$	$7,8 \pm 0,08$
НКТ (CD3+CD16+CD56+), тыс./мкл	$0,130 \pm 0,04$	$0,141 \pm 0,03$	$0,178 \pm 0,03$
НКА (CD3-CD16+CD56+CD107A), (%)	$1,3 \pm 0,1^{**}$	$1,4 \pm 0,3^{**}$	$2,7 \pm 1,1^{**}$
НКА (CD3-CD16+CD56+CD107A), (тыс./мкл)	$0,089 \pm 0,01$	$0,094 \pm 0,08$	$0,127 \pm 0,03$

Примечание: ** – $p < 0,05$ достоверность различий между группой контроля и пациентками с ГИЭ

Также у данных групп больных был оценен уровень индуцировано активированных НК-клеток (НКА+), который мы рассматриваем как наиболее информативный показатель. Уровень индуцированной активности НК-клеток у больных с рецидивом заболевания был снижен почти в 2 раза относительно группы контроля. У пациенток с впервые выявленным ГИЭ данный показатель был снижен в 1,4 раза по сравнению с пациентками в группе контроля (рисунок 1).

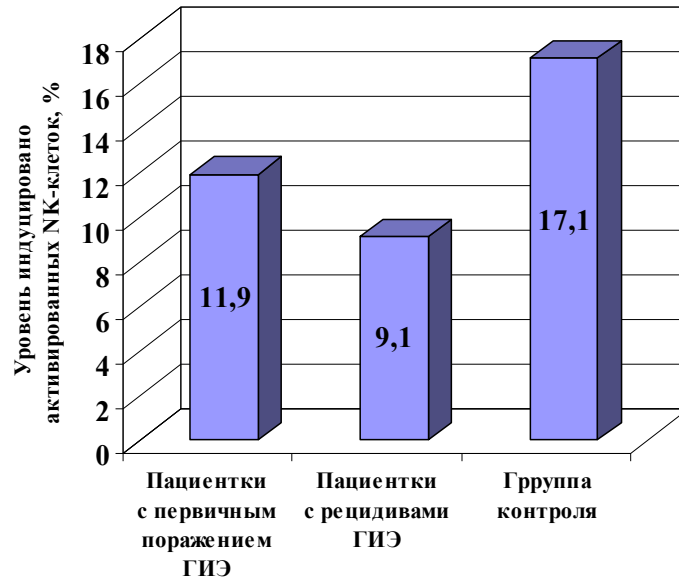


Рисунок 1 – Уровень индуцированной активности НК-клеток у больных с впервые выявленным ГИЭ и рецидивом заболевания, а также в группе контроля

Уровень цитокинов, хемокинов и факторов роста в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ

У больных с ГИЭ было обнаружено снижение в перитонеальной жидкости уровня ИЛ-2 по сравнению с контрольной группой составившего в условных единицах СИФ (средняя интенсивность флуоресценции) $37,5 \pm 2,5$ и $77,11 \pm 0,9$ соответственно ($p < 0,01$), что свидетельствует об уменьшении эффективности клеточного и гуморального иммунного ответа;

Уровень ИЛ-10 в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ находился в прямой корреляционной зависимости от уровня ИЛ-2 ($r = 0,75$). Было отмечено его достоверное снижение по сравнению с контрольной группой в 2,1 раза ($25,8 \pm 2,2$ и $50,1 \pm 4,4$ СИФ соответственно, $p < 0,01$). Снижение ИЛ-10 приводит к уменьшению огранивающего влияния данного цитокина на воспалительную реакцию.

Отмечено достоверное повышение уровня ИЛ-6 в перитонеальной жидкости у больных с ГИЭ по сравнению с контрольной группой в 1,2 раза ($40,7 \pm 4,5$ и $33,1 \pm 4,9$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$), за счет чего поддерживается персистенция воспалительной реакции и потенцируется интенсивность болевого синдрома.

В перитонеальной жидкости у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом было отмечено достоверное повышение уровня ИЛ-33 в 13,8 раз по сравнению с группой контроля ($139,4 \pm 2,2$ пкг/мл и $10,1 \pm 2,8$ пкг/мл соответственно, $p < 0,01$), что свидетельствует о возможной важной патогенетической роли этого цитокина в регуляции воспалительного процесса и развития эндометриоидных гетеротопий.

Уровень FGF у пациенток с ГИЭ был повышен в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой (СИФ $51,9 \pm 2,1$ и $39,3 \pm 0,9$ соответственно, $p < 0,05$). Повышение данного ростового фактора ведет к развитию соединительной ткани в области инфильтрата. Также было обнаружено достоверное снижение уровня TGF- β в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ в 1,6 раз и составившее $1061,8 \pm 135,4$ СИФ, в контрольной группе – $1739,51 \pm 40,3$ СИФ ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о снижении иммуносупрессии и возможной индукции васкуляризации эндометриоидного инфильтрата.

Показано достоверное снижение уровня хемокина IP-10 в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ в 2,9 раза по сравнению с контрольной группой ($656,7 \pm 66,1$ пкг/мл и $1949,1 \pm 75,1$ пкг/мл, соответственно, $p < 0,01$), что обеспечивает прогрессирование данной формы заболевания за счет неоангиогенеза. Уровень MCP-1, напротив, был повышен в 2 раза по сравнению с пациентками из группы контроля и составил $274,7 \pm 31,1$ пкг/мл и $142,2 \pm 12,1$ пкг/мл соответственно, что способствует привлечению в очаг инфильтрации моноцитов и лимфоидных клеток и усилению интенсивности воспалительного процесса.

Результаты определения уровней цитокинов, факторов роста и хемокинов в перитонеальной жидкости представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Уровень интерлейкинов, факторов роста и хемокинов в перитонеальной жидкости пациенток с ГИЭ и в контрольной группе

Показатель	Пациентки с ГИЭ (N=170)	Группа контроля (N=20)	Достоверность
ИЛ-2 (СИФ)	37,5±2,5*	77,1±0,9	*p<0,01
ИЛ-10 (СИФ)	25,8±2,2*	50,1±4,4	* p<0,01
ИЛ-6 (пкг/мл)	40,7±4,5**	33,1±4,9	** p<0,05
ИЛ-33 (пкг/мл)	139,4±2,2*	10,1±2,8	*p<0,01
FGF (СИФ)	51,9±2,1**	39,3±0,9	**p<0,05
TGF-β (СИФ)	1061,8±135,4**	1739,5±40,3	**p<0,05
IP-10 (пкг/мл)	656,7±66,1*	1949,1±75,1	*p<0,01
MCP-1 (пкг/мл)	274,7±31,1*	142,2±12,1	*p<0,01

На основании визуально-аналоговой шкалы боли в послеоперационном периоде во всех группах оценивали выраженность болевого синдрома вне и во время менструаций, при половой жизни.

Результаты динамической оценки болевого синдром на фоне различных схем медикаментозной терапии приведены в таблице.

Таблица 3 – Эффективность купирования болевого синдрома в зависимости от выбранной послеоперационной терапии

Медикаментозная терапия	Оценка болевого синдрома					
	Болевой синдром до лечения (ВАШ баллы)			Болевой синдром после лечения (ВАШ баллы)		
	во время менструаций	вне менструаций	при половой жизни	во время менструаций	вне менструаций	при половой жизни
аГнРГ 3,75 мг № 6 (n=40)	8,1	5,6	4,6	2,8**	2,1**	1,8**
Диенгест 2 мг до 6 месяцев (n=40)	6,9	6,3	5,5	2,5**	2,2**	1,9**
аГнРГ 3,75 мг в сочетании с Ронколейкином (n=35)	8,2	4,7	5,8	2**	1,3**	1,4**
Диенгест 2 мг в сочетании Ронколейкином (n=35)	7,8	5,8	5,1	2,1**	1,4**	1,4**

Примечание: ** – p<0,05 – достоверность различий между группой пациенток, получавших Ронколейкин и пациентками, которые получали только гормонотерапию

Таким образом, при применении рекомбинантного ИЛ-2, в качестве дополнительного средства иммуномодулирующей терапии, отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение болевого синдрома по сравнению с больными, получавшими только гормонотерапию. В группе больных, получавших в качестве гормонотерапии аГнРГ в сочетании с ронколейкином, болевой синдром снизился в 1,6 раза по сравнению с пациентками, применявшими только аГнРГ. У больных, которые получали диенгест 2 мг в сочетании с рекомбинантным ИЛ-2, отмечалось более выраженное снижение болевого синдрома (в 1,3 раза) по сравнению с пациентками, получавшими только диенгест.

На фоне иммуномодулирующей терапии Ронколейкином отмечено достоверное повышение уровня активированных НК-клеток у пациенток с ГИЭ в 1,2 раза по сравнению со значениями до начала терапии.

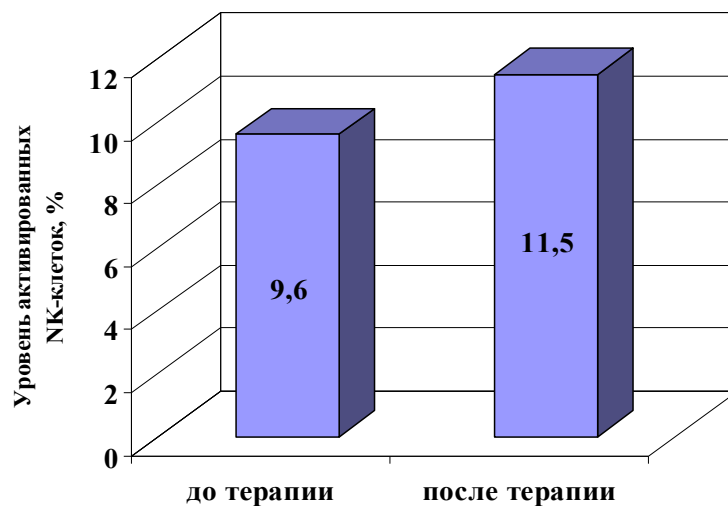


Рисунок 2 – Уровень активированных НК-клеток до и после терапии Ронколейкином

Для объективизации данных об эффективности иммуномодулирующей терапии нами был предложен коэффициент стимуляции (КС) НК-клеток, который рассчитывался по формуле:

$$КС_{НК-клеток} = \frac{\text{акт НК-клетки 2} - \text{акт НК-клетки 1}}{\text{акт НК-клетки 1}} * 100\%, \text{ где:}$$

акт НК-клетки 1 – содержание активированных НК-клеток до проведения иммуномодулирующей терапии;

акт НК-клетки 2 – содержание активированных НК-клеток, после проведенной иммуномодулирующей терапии.

Было показано, что у больных, получавших иммуномодулирующую терапию в составе комбинированной терапии ГИЭ, положительный клинический эффект, проявлявшийся в значимом снижении болевого синдрома, коррелировал с положительным коэффициентом стимуляции, средняя величина которого составила $0,13 \pm 0,2$ ($p < 0,005$) У пациенток, которые отметили незначительное клиническое улучшение, коэффициент стимуляции был отрицательным и в среднем составил $-0,11 \pm 0,04$ ($p < 0,05$).

В связи с тем, что основным патогенетическим механизмом рецидивирования и прогрессирования глубокого инфильтративного эндометриоза являются нарушения в иммунной системе, которые приводят к персистенции воспалительной реакции, неоангиогенезу в области эндометриоидных инфильтратов и прогрессированию заболевания, весьма обоснованным является применение в комплексной терапии препаратов, влияющих именно на эти звенья патогенеза. Рекомбинантный ИЛ-2 восполняет необходимый уровень данного цитокина, который у больных с глубоким инфильтративным эндометриозом и его рецидивами снижен в перитонеальной жидкости в 2 раза, по сравнению с пациентками контрольной группы. Повышая концентрацию ИЛ-2 в полости малого таза, можно добиться повышения уровня ИЛ-10, который обладает противовоспалительным действием и иммунорегуляторным, реализуемым через Т-регуляторные лимфоциты. Кроме того, ИЛ-2 является антагонистом ИЛ-6, который, в свою очередь, служит хемоаттрактантом для активированных лимфоцитов и частично блокирует их апоптоз. Также нельзя не отметить влияние рекомбинантного ИЛ-2 на повышение пула активированных НК-клеток как самостоятельно, так и опосредованно, за счет количественного увеличения ИЛ-2 в перитонеальной жидкости, что создает дополнительные условия для резорбции эндометриоидной гетеротопии.

Ф.И.О. _____

Возраст _____ № и/б _____

Пересмотренная классификация Американского общества фертильности (R-AFS)

Поражение и локализация		Детализация поражения, баллы			
		<1 см	1-3 см	>3 см	
Брюшина	поверхностный	1	2	4	
	глубокий	2	4	6	
Яичники	правый	поверхностный	1	2	4
		глубокий	4	16	20
	левый	поверхностный	1	2	4
		глубокий	4	16	20
Облитерация позадииматочного пространства		частичная	полная		
		4	40		
Спайки		вовлечено <1/3	вовлечено 1/3-2/3	Вовлечено >2/3	
Яичник	правый	тонкие	1	2	4
		плотные	4	8	16
	левый	тонкие	1	2	4
		плотные	4	8	16
Маточная труба	правая	тонкие	1	2	4
		плотные	4	8	16
	левая	тонкие	1	2	4
		плотные	4	8	16
Локализация	Б	ПКМ	ЛКМ	ВЛ	ПК
Эндометриоз					
Локализация	ПМ	ЛМ	МП	Д	БС
Экстрагенитальный эндометриоз					

Характер течения заболевания:

Первичное поражение

Рецидив

Цвет гетеротопий

Прозрачные	<input type="checkbox"/>
Белые	<input type="checkbox"/>
Красные	<input type="checkbox"/>
Фиолетовые	<input type="checkbox"/>
Черные	<input type="checkbox"/>

Репродуктивные планы
Да Нет

Диагноз глубокого инфильтративного эндометриоза

Оценка болевого синдрома на основании ВАШ

Вне менструаций	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Во время менструаций	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Диспареуния	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Баллы НГЭ	Результаты гормонального обследования после оперативного лечения									
Баллы спаечной болезни	ФСГ									
Всего баллов НГЭ	Пролактин									
Степень НГЭ	АМГ									
	ТТГ									

Заключительный диагноз:

Гормональная терапия в анамнезе

Комбинированные контрацептивы	<input type="checkbox"/>	Антигонадотропины	<input type="checkbox"/>
Даназол	<input type="checkbox"/>	Агонисты гонадотропин-рилизинг гормона	<input type="checkbox"/>
Ингибиторы ароматазы	<input type="checkbox"/>	Визанна (диеногест) 2 мг	<input type="checkbox"/>

При сочетании применения рекомбинантного ИЛ-2 с агонистами гонадотропин релизинг гормона и/или диеногестом 2 мг в послеоперационном периоде отмечено повышение количества активированных НК-клеток, что сопровождается клиническим улучшением, проявляющимся в снижении болевого синдрома в 3,9 раза по сравнению с исходным, причем у больных как с первичным поражением, так и с рецидивом глубокого инфильтративного эндометриоза.

Для обеспечения универсального подхода к обследованию больных с глубоким инфильтративным эндометриозом, возможности подбора наиболее эффективной терапии для планирования беременности и профилактики рецидивов заболевания, в том числе дистанционно, и преемственности с различными специалистами акушерско-гинекологической службы нами был разработан протокол, представленный ниже.

В данной форме учитываются исчерпывающие данные об интраоперационном обследовании, включая цвет эндометриоидных гетеротопий, используемая рутинно классификация R-AFS, а также модифицированная классификацию ENZIAN SCORE, которая является более информативной и удобной для описания пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом. Также в форме есть анамнестические данные об интенсивности болевого синдрома, результатах гормонального обследования и предыдущих видах гормономодулирующей терапии, что будет в последующем являться отправной точкой для выбора эффективной и безопасной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее характерным клиническим проявлением глубокого инфильтративного эндометриоза является болевой синдром, встречающийся у 94% пациенток, включающий альгодисменорею у 84%, диспареунию – у 69%, диффузную тазовую боль – у 54%; сочетание всех трех видов боли отмечено в 75% случаев. Болевой синдром средней степени интенсивности (интегральная оценка всех видов боли от 3 до 7 баллов на основании визуально-аналоговой шкалы (ВАШ)) отмечен у 56% больных, у 21% пациенток – выраженный болевой синдром (8-10 баллов по ВАШ).

2. Глубокий инфильтративный эндометриоз характеризуется бесплодием у 75% женщин, рецидивирующим течением заболевания у 42% больных, сочетанием в 14% случаев с экстрагенитальным эндометриозом (эндометриозом диафрагмы в 2% случаев, передней брюшной стенки в 3%, прямой кишки у 6% больных и эндометриозом мочевого пузыря у 3% пациенток) и спаечным процессом органов брюшной полости и малого таза у 84% пациенток.

3. У пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом цитокиновый профиль перитонеальной жидкости характеризовался повышением уровня провоспалительных цитокинов: ИЛ-6 в 1,2 раза по сравнению с уровнем в группе контроля ($40,7 \pm 4,5$ и $33,1 \pm 4,9$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$), а также уровня хемокина MCP-1 в 2 раза по сравнению с уровнем в контрольной группе ($274,7 \pm 31,1$ и $142,2 \pm 12,1$ соответственно, $p < 0,05$), что свидетельствует о развитии и персистенции воспалительной реакции и может играть роль в усилении болевого синдрома.

4. В перитонеальной жидкости пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом отмечено достоверное повышение уровня ИЛ-33 в 13,8 раз по сравнению с уровнем в группе контроля ($139,1 \pm 2,2$ пкг/мл и $10,1 \pm 2,8$ пкг/мл соответственно, $p < 0,01$), а также уровнем FGF в 1,3 раза, по сравнению с уровнем в контрольной группе (СИФ $51,9 \pm 2,1$ и $39,3 \pm 0,9$ соответственно, $p < 0,05$), что также свидетельствует о выраженности воспалительного процесса и интенсивности образования соединительной ткани в области эндометриоидного инфильтрата.

5. У больных с глубоким инфильтративным эндометриозом в перитонеальной жидкости отмечено достоверное снижение уровня ИЛ-2 в 2,1 раза по сравнению с аналогичным показателем в группе контроля (СИФ $37,5 \pm 2,5$ и $77,11 \pm 0,9$ соответственно, $p < 0,01$), ИЛ-10 в 2,1 раза по сравнению с уровнем в группе контроля (СИФ $25,8 \pm 2,2$ и $50,1 \pm 4,4$ соответственно, $p < 0,05$), TGF- β в 1,6 раза по сравнению с уровнем контрольной группой (СИФ $1739 \pm 40,3$ и $1061,8 \pm 135,4$ соответственно, $p < 0,01$). Содержание IP-10 также было достоверно снижено в 2,9 раза по сравнению с уровнем в группе контроля ($656,7 \pm 66,1$ пкг/мл и $1949 \pm 75,1$ пкг/мл соответственно, $p < 0,01$), что свидетельствует о нарушении процессов контроля воспалительной реакции и ангиогенеза.

6. У больных с глубоким инфильтративным эндометриозом достоверно снижено в периферической крови содержание спонтанно активированных НК-клеток с фенотипом CD3-CD16-CD56-CD107A в 2 раза по сравнению с группой контроля ($1,3\pm 0,1\%$ и $2,7\pm 1,1\%$ соответственно $p<0,05$). Уровень индуцировано активированных НК-клеток в периферической крови у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом также был снижен по сравнению с контрольной группой ($10,1\pm 2,3\%$ и $17,1\pm 1,4\%$ соответственно, $p<0,05$), что указывает на уменьшение цитотоксического потенциала.

7. Установлена достоверная связь между уровнем ИЛ-6 и ИЛ-33 в перитонеальной жидкости у пациенток с ГИЭ и степенью выраженности болевого синдрома. Максимальный уровень ИЛ-6 ($45,6\pm 6,9$ пкг/мл) определялся у пациенток с выраженным болевым синдромом, при этом уровень ИЛ-33 был в 8,4 раза выше при болевом синдроме средней интенсивности по сравнению с женщинами с невыраженным болевым синдромом ($87,6\pm 35,6$ пкг/мл и $10,1\pm 6,8$ пкг/мл соответственно, $p<0,01$).

8. Сочетание рекомбинантного ИЛ-2 и гормональной терапии (депо-форма ГнРГ или Диеногеста 2 мг) у больных с ГИЭ сопровождается достоверным повышением эффективности лечения в 2 раза и снижением числа рецидивов заболевания по сравнению со стандартной схемой гормонотерапии ($10,1\%$ и $22,3\%$ соответственно) в течении первого года наблюдения. При этом отмечено достоверное повышение уровня активированных НК-клеток в периферической крови ($9,6\pm 1,2\%$ и $11,5\pm 1,5\%$, до и после терапии соответственно, $p<0,05$). Наиболее достоверным критерием оценки эффективности иммуномодулирующей терапии является коэффициент стимуляции активированных НК-клеток, коррелирующий с уменьшением выраженности болевого синдрома.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных с ГИЭ для оценки эффективности терапии и снижение риска развития рецидива рекомендовано определение уровня активированных НК-клеток в динамике. Наиболее информативным показателем является Коэффициент Стимуляции (КС) НК-клеток, рассчитанный по формуле:

$$КС_{\text{NK-клеток}} = \frac{\text{акт NK-клетки 2} - \text{акт NK-клетки 1}}{\text{акт NK-клетки 1}} * 100\%, \text{ где:}$$

акт NK-клетки 1 – содержание активированных NK-клеток до проведения иммуномодулирующей терапии;

акт NK-клетки 2 – содержание активированных NK-клеток, после проведенной иммуномодулирующей терапии.

Высокая эффективность терапии была отмечена у пациенток с положительным коэффициентом стимуляции, который в среднем составил $0,13 \pm 0,2$ ($p < 0,005$), низкая эффективность терапии была отмечена у больных с отрицательным коэффициентом стимуляции ($-0,11 \pm 0,04$ ($p < 0,05$)).

2. Применение иммуномодулирующей терапии рекомбинантным интерлейкином-2 показано больным с рецидивирующей формой ГИЭ, а также пациенткам с выраженным болевым синдромом. Целесообразно интраоперационное введение ронколейкина в полость малого таза после завершения оперативного приема в дозе 500 000 МЕ, затем внутривенно капельно каждые 48 часов в той же дозировке на разведении в 400 мл 0,9% физиологического раствора натрия хлорида № 3, со средней скоростью 20 кап./мин. Средняя продолжительность инфузии 3,5 ч.

3. Больным с ГИЭ в анамнезе рекомендуется один раз в 12 месяцев в динамике оценивать уровень NK-клеток и их активированных форм в периферической крови для своевременного выявления рецидивов заболевания.

4. Для обеспечения преемственности среди специалистов акушерско-гинекологического профиля и более точного описания ГИЭ необходимо применять наряду с классификацией R-AFS, классификацию ENZIAN SCORE, а также предложенный в диссертационной работе протокол обследования пациенток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Иммунологические нарушения у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом/ Д.З. Цицкарава, М.И. Ярмолинская, А.А. Цыпурдеева, В.В. Рулев, А.В. Селютин, С.А. Сельков // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.65, спецвып. – С.68-69.

2. Классификация эндометриоза / Э.К. Айламазян, М.И. Ярмолинская, А.С. Молотков, Д.З. Цицкарава // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. LXVI, N 2. – С.77-92. DOI 10.17816/JOWD66277-92.

3. Оценка содержания и патогенетической роли цитокинов перитонеальной жидкости у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом /Д.З. Цицкарава, М.И. Ярмолинская, А.В. Селютин, С.А. Сельков// Журнал акушерства и женских болезней. –2017. – Т. LXVI, N1. –с. 38-45. DOI:10.17816/ JOWD66138-45.

4. Сравнение эффективности различных схем гормонотерапии после хирургического лечения наружного генитального эндометриоза /В.Ф. Беженарь, М.И. Ярмолинская, Е.Н. Байлюк, А.А. Цыпурдеева, Д.З. Цицкарава, Е.В. Моругина, Т.Б. Постникова, Е.Л. Орехова // Проблемы репродукции. – 2015. – N4. – С.89-98.

5. Цитокины как маркеры для неинвазивной диагностики генитального эндометриоза /М.И. Ярмолинская, Д.З. Цицкарава, С.А. Сельков // Журнал акушерства и женских болезней. -2015. – Т.LXIV, N 6. -С.6-16

6. Эффективность цитокинолтерапии в комбинированном лечении больных с глубоким инфильтративным эндометриозом /Д.З. Цицкарава, М.И. Ярмолинская, С.А. Сельков // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.65, спецвып. – С.66-68.

7. Опыт применения рекомбинантного интерлейкина-2 с целью повышения цитотоксической активности НК-клеток у больных с глубоким инфильтративным эндометриозом / Д.З. Цицкарава, М.И. Ярмолинская, С.А. Сельков// Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т.66, спецвып. – С.86-87.

8. Опыт применения рекомбинантного человеческого IL-2 в комбинированной терапии глубоких инфильтративных форм эндометриоза / Д.З. Цицкарава, М.И. Ярмолинская, С.А. Сельков, А.А. Цыпурдеева, Е.Н. Байлюк// Terra Medica. – 2015. – № 4 (82). – С.57-58.

9. Оценка влияния разных групп гормональных препаратов на частоту рецидивов генитального эндометриоза / М.И. Ярмолинская, А.А. Цыпурдеева, Е.Н. Байлюк, А.С. Молотков, Т.О. Ефименко, Д.З. Цицкарава, Н.Ф. Ганбарли // Terra Medica. – 2015. – №4(82). – С.59-60.