

На правах рукописи

ПИМАНЧЕВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МАТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НЕУПРУГОГО СВЕТОВОГО РАССЕЙВАНИЯ**

14.01.01- Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Зуев Владимир Михайлович

Официальные оппоненты:

Хашукоева Асият Зульчифовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, профессор кафедры; ответственная за клиническую базу в отделении гинекологии ОСП ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, акушер-гинеколог

Федорова Татьяна Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова», отделение трансфузиологии и экстракорпоральной гемокоррекции, акушер-гинеколог, заведующая отделением

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» (ГБУЗ МО МОНИИАГ)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.03 в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2).

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) <http://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д **208.040.03**

Доктор медицинских наук, профессор

Шулутко Александр Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность исследования

Доброкачественные заболевания эндометрия – гиперплазия эндометрия (ГЭ), полипы (ПЭ), хронический эндометрит (ХЭ), «гормональная регрессия эндометрия» (ГРЭ) - занимают важное место среди женских болезней. Частота их высока и имеет тенденции к возрастанию. Эта проблема имеет социальный характер, так как связана с кровотечениями и снижением «качества жизни», бесплодием и высоким риском возникновения рака матки, который занимает второе место у гинекологических больных. [Каприн А.Д, 2017, Сухих Г.Т. 2013, Чиссов В.И., 2003] Другая опасная тенденция – рак эндометрия у молодых женщин 25-30 лет. [Ашрафян, 2007, Новикова Е.Г. 2004, Табакман, 2009, Vircan S., et al., 2005]

Особое место занимают гиперпластические процессы эндометрия и хронические эндометриты у женщин старше 35 лет, которые по разным причинам не имели беременности. Они часто прибегают к вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ). Гиперпластические процессы эндометрия ограничивают возможность использования ЭКО и ПЭ, и порою исключают их в случае пограничных с раком состояний.

Эти современные тенденции развития доброкачественных и пограничных заболеваний эндометрия свидетельствуют о необходимости современной своевременной эффективной скрининговой диагностики и эффективном лечении с экспресс-мониторингом «по месту» на принципах обратной связи. [Александров М.Т. 2008, Ашрафян Л.А. 2007]

Традиционная современная диагностика хорошо известна. Широко применяются УЗИ, цветное доплеровское картирование и доплерометрия. Используется магнитно-резонансная томография. Однако, для верификации диагноза требуется морфологический анализ субстрата и время для ожидания результатов исследования. [Адамян Л.В. 2008, Каппушева Л.М. 2005, Mutter В., et. al., 2011]. «Стандартом» диагностики гиперпластических процессов эндометрия являются гистероскопия, диагностическое выскабливание и гистологическое исследование соскоба. Однако данный метод травматичен, активизирует воспаление и оказывает выраженное отрицательное воздействие на эндометрий и репродуктивную систему в целом. [Кузнецова И.В., 2007, Шешукова Н.А., 2011]

В последние годы в медицинскую практику внедрены экспресс-диагностические методы лазерной конверсионной диагностики (ЛКД) и ее спектральной раман- флюоресцентной составляющей. Методы экспресс-анализа тканей основаны на регистрации спектров раман-и / или люминесцентного свечения и отражают метаболизм, морфометрические особенности, функциональное состояние тканей и основаны на явлении упругого и неупругого рассеяния оптического излучения на молекулах. [Александров М.Т., 2008, Кукушкин И.В.]

Однако известные исследования касаются только воспалительных заболеваний микробной и опухолевой природы в общехирургической практике. Исследования по экспресс-диагностике гиперпластических и воспалительных процессов женских половых органов, мониторинга их лечения, оценки его эффективности, аппаратно-программное обеспечение, алгоритмы и клинические методики исследования эндометрия к моменту настоящего исследования не разрабатывались.

Цель исследования Повысить эффективность, качество диагностики и лечения гиперпластических процессов эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и бесплодием в программах ВРТ на основе использования в комплексном лечении лазерной конверсионной экспресс-диагностики и объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии.

Задачи исследования

1. Разработать концепцию лазерной: гиперпластических процессов эндометрия (ГПЭ) и хронического эндометрита у женщин с бесплодием в программах ВРТ старше 30 лет.
2. Разработать алгоритм и определить информативные показатели лазерной конверсионной диагностики (ЛКД) нормального и патологически измененного эндометрия при гиперпластических процессах и у женщин с иной (трубно-перитонеальной) формой бесплодия в возрастной категории старше 30 лет.
3. На основе применения ЛКД технологий (раман- и флюоресцентная составляющая) экспериментально обосновать медицинскую технологию объемной фото-ингибирующей (ФИГТ) и фото-иммунной терапии (ФИТ), активированной лазерным излучением с применением хлорофилл содержащего препарата.
4. Разработать клинический метод объемной лазерной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии для лечения ГПЭ у женщин с бесплодием в программах ВРТ

5. Оценить клиническую эффективность разработанных методов ЛКД экспресс-диагностики и объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии у женщин с бесплодием.

Научная новизна исследования

Разработан высокочувствительный метод лазерной конверсионной экспресс-диагностики гиперпластических и воспалительных процессов эндометрия. Создан алгоритм диагностических и лечебных мероприятий для женщин с бесплодием и ГПЭ на этапах прегравидарной подготовки. Впервые изучены спектральные характеристики различных форм гиперплазии эндометрия у женщин с бесплодием, на основе которых разработан объективный комплексный метод фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии женщин с гиперпластическими процессами эндометрия, планирующих беременность с использованием хлорофилл содержащего препарата природного происхождения.

Впервые произведена оценка эффективности лазерной конверсионной экспресс-диагностики гиперпластических процессов эндометрия и клинической эффективности, фото-ингибирующей и объемной фото-иммунной терапии, активированной лазерным излучением с использованием природного хлорофилл содержащего препарата у женщин с бесплодием в программах ВРТ.

Практическая значимость исследования Разработана и используется в практике не инвазивная лазерная конверсионная экспресс-диагностика гиперпластических и воспалительных процессов эндометрия. Разработан метод гистеро-спектроскопии, позволяющий проводить прицельную «оптическую» биопсию с высокой степенью корреляции с гистологическим исследованием. Определены спектрометрические характеристики различных изолированных форм гиперпластических процессов и в сочетании с хроническим эндометритом. Определены показания, условия и методики проведения лазерной конверсионной спектроскопии у женщин с гиперплазией эндометрия, хроническим эндометритом и бесплодием. Выявлена зависимость спектроскопических картин эндометрия от формы, распространенности и локализации очаговых и диффузных вариантов гиперплазии и от формы (очаговый, диффузный) хронического эндометрита.

Разработан и используется в практике высокоэффективный негормональный метод лечения ГПЭ, основанный на объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной

терапии, активированной лазерным излучением с применением безопасных природных хлорофилл содержащих препаратов.

Разработанная технология экспресс-диагностики гиперпластических и предраковых процессов эндометрия, позволила на доклиническом этапе выявить группы «риска» женщин по отношению к раку матки и может быть использована при проведении массовых диспансерных обследований женщин. Это реальный путь сокращения онкологической заболеваемости и смертности женского населения Российской Федерации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Лазерная конверсионная экспресс-диагностика (люминесцентная составляющая) позволяет не инвазивно и мгновенно диагностировать наличие гиперпластического процесса эндометрия у женщин с бесплодием.
2. Флюоресцентная спектральная экспресс-диагностика позволяет определять патогенетические механизмы развития гиперпластических процессов эндометрия и способствует саногенетической оптимизации тактики ведения и лечения пациенток.
3. Лазерная конверсионная экспресс-диагностика обеспечивает мониторинг накопления хлорофилл содержащего препарата в тканях эндометрия и динамику изменения его метаболизма, их структуры и функции.
4. Метод объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии гиперпластических процессов эндометрия у женщин с бесплодием в программах ВРТ является высоко эффективным не хирургическим и негормональным альтернативным способом лечения.

Внедрение результатов в практику

Метод лазерной конверсионной экспресс-диагностики и объемной фото-иммунной терапии используется в практике клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, лечебно-реабилитационного центра Минздрава РФ, клиники репродуктивного здоровья АРТ-ЭКО, клиники репродукции человека г. Барнаула, Российского центра репродукции человека г. Сочи

Работа выполнена на клинических и лабораторных базах Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, (Сеченовский

Университет), Онкологического Научного центра им. Н.Н. Блохина, лечебно-реабилитационного центра МЗ РФ, клиники репродуктивного здоровья АРТ-ЭКО.

Апробация работы

Основные материалы диссертации представлены и обсуждены на: XXV Юбилейной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра», Сочи 2015, Ежегодных научно-практических конференциях «Снегиревские чтения 2015-2018 гг., Москва, XVI международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки XXI века», Москва, 2016, XI международном конгрессе по репродуктивной медицине., Москва 2017, XVII Всемирном конгрессе по репродукции человека, Рим, 2017, XII конгрессе «Европейского Общества акушеров-гинекологов», Барселона, 2017, XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине, Москва, 16-19 января 2018 г., XVIII Всемирном конгрессе по эндокринологической гинекологии,

Личный вклад автора

Автором лично было проведено обследование и лечение 108 пациенток репродуктивного возраста, планировавших беременность и обратившихся в клинику акушерства и гинекологии и репродуктивного здоровья. Автор лично принимал участие в разработке технологии лазерной конверсионной диагностики, программного обеспечения и объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии. Выбор предпочтений для метода лазерной диагностики в программе реабилитации, расчеты параметров лазерной внутриматочной активации препарата и терапии, статистическая обработка полученных научных данных, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.01.01 – Акушерство и гинекология, а также области исследования согласно п. 4 - Разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний. Оптимизация диспансеризации беременных и гинекологических больных.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 154 листах компьютерного текста, содержит 8 таблиц, 19 рисунков и графиков. Библиографический указатель включает 213

источников, из них 142 отечественных и 71 иностранных авторов. Состоит из введения, 6 глав, обсуждения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих её основное содержание, из них 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика обследованных пациенток и методы исследования

Исследование было разделено на 2 части – экспериментальную и клиническую. Экспериментальная часть, целью которой была разработка метода лазерной конверсионной диагностики гиперпластических процессов эндометрия и объемной фото-ингибирующей и фото-стимулирующей терапии, выполнялась на базе НИЦ Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Зав.- Проф. Е.И. Эрнес). Клиническая часть исследования проводилась на базе клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, лечебно-реабилитационного Центра (ЛРЦ) Минздрава Российской Федерации и клиники репродуктивного здоровья Арт-эко (дир. д.м.н. Е.А. Калинина).

В экспериментальной части с целью разработки метода лазерной конверсионной диагностики гиперпластических процессов эндометрия и фото-ингибирующей терапии в качестве модельного объекта использовали культуру микробных тел (три вида: линейные штаммы стафилококка, стрептококка и устойчивого к современным антибиотикам клинического штамма синегнойной палочки) -20 тест образцов (из них 5 контрольная группа) и культуру карциномы Эрлиха (45 тест образцов и 15-контрольная группа). Для исследования использовали лабораторных мышей - 60 тест объектов, которым внутривентрально вводили 0.1 мл культурального материала).

Этапы пробоподготовки фотосенсибилизатора (хлорофилл содержащий препарат) включали в себя: 1) Выбор фотосенсибилизатора с наибольшим квантовым выходом люминесценции при его резонансном облучении. 2) Выбор оптимальных параметров дозы облучения при диагностике и лечении заболеваний. 3) Исследование действия активированного препарата на антимикробную активность. 4) Исследование

действия, активированного хлорофилл содержащего препарата на клетки карциномы Эрлиха на тест объектах животных. 5) Анализ результатов исследования, как обоснование его клинического применения. Разработка алгоритмов и методики клинического применения активированного препарата.

Клиническая часть исследования

Обследованные 126 женщин были разделены на 2 группы, - основную (80) и группу сравнения (46), сопоставимых по возрасту с документально подтвержденным отсутствием гиперплазии эндометрия и хронического эндометрита. Все женщины обратились в клинику в связи с бесплодием с целью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО и ИКСИ).

Критерием включения было первичное или вторичное бесплодие, гиперплазия эндометрия и хронический эндометрит. Критерием исключения стали атипичная гиперплазия эндометрия, рак эндометрия или отказ женщины от участия в программе исследования. Основой для формирования групп был клинический и верифицированный морфологический диагноз ГЭ и ХЭ. Анализ внутри групп проводился в зависимости от морфологического варианта ГЭ, морфологических особенностей ХЭ и сочетанных форм заболеваний.

К репродуктивному возрасту относили (согласно классификации, ВОЗ) женщин 18-47 лет. Все обследованные пациентки были сопоставимы между собой по возрасту, основным данным анамнеза, менструальной, репродуктивной функции и сопутствующим экстрагенитальным заболеваниям.

Оценку репрезентативности групп определяли по формулам оценки репрезентативности для количественных и качественных признаков при неодинаковом числе наблюдений в группах.

Методы исследования

Клинико-лабораторное обследование включало: сбор анамнестических данных, общий осмотр, гинекологическое исследование, ультразвуковое исследование.

Исследование гормонального профиля (содержание эстрадиола, ФСГ, ЛГ, пролактина и прогестерона, ТТГ, Т3, Т4, ДГА-С, 17-ОП) проводили в Центральной межклинической лаборатории Клинического Центра ПМГМУ им. И. М. Сеченова (зав. лабораторией – к. м. н. Е. П. Гитель). Количественное определение гормонов

выполнено с помощью стандартных наборов иммунохемилюминисцентным методом на автоматической системе «ACS-180 PLUS».

Определение состояния шейки матки осуществляли с помощью, расширенной кольпоскопии на кольпоскопе фирмы «Karl Zeis» и цитологического исследования. Ультразвуковое исследование осуществляли на аппарате «Acuson128XP/10 (США) с трансвагинальным конвексным датчиком ЕС7 с частотой 7МГц и трансабдоминальным датчиком С3 с частотой 3, 5 МГц, и «Toshiba-SSH-140А» с трансвагинальным конвексным датчиком с частотой 6, 5 МГц и проводили в режиме реального времени: общее исследование матки и придатков и цветное доплеровское картирование. Всем женщинам производили «офисную» мини – гистероскопию и прицельную биопсию. Использовали офисный гистероскоп фирмы «Karl Storz» с диаметром дистального отдела 2, 7 мм.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Исследование биоптатов и соскобов эндометрия осуществляли на кафедре и в лаборатории патологической анатомии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (зав. каф – проф. В. С. Пауков). Иммуногистохимическое исследование выполнено на объектах от 42 пациенток. Объектом сравнения были женщины с ГЭ, ХЭ и без признаков патологии. Использовались серийные парафиновые срезы толщиной от 4 мкм иммунопероксидазным методом двойных антител с предварительной демаскировкой антигенов в СВЧ-печи в течение 20 минут выявляли биомолекулярные маркеры: Ki-67, P53, TGF- β , ER и PR.

Использовались **молекулярно-биологические методы** для определения инфекций, передающихся половым путем – вирусов папилломы человека (ВПЧ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса простого герпеса (ВПГ) I и II типов, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealiticum, Micoplasma hominis методом ПЦР и **микробиологическое исследование** для выявления условно-патогенных микроорганизмов с определением их чувствительности к антибиотикам.

Специальные методы исследования. Метод лазерной конверсионной диагностики (ЛКД)

Лазерная Раман - флюоресцентная диагностика и ауто-ингибирующая терапия проводили под объективным контролем, который включал в себя: индикацию клеточной пролиферативной активности эндометрия; оценку интенсивности

микроциркуляции поверхностных слоев эндометрия ;оценку интенсивности аэробного и анаэробного метаболизма.; оценку нормальных и измененных тканей при воспалительных и неопластических процессах ;мониторинг указанных метаболических клеточных и тканевых показателей; оценку морфометрических, изменений, оценку эффективности лечения, в том числе по нормализации указанных клинических, метаболических и морфометрических показателей. [Александров М.Т. 2008, В.М. Зуев, 2016]

В качестве фотосенсибилизирующего препарата для его активации в эндометрии использовали хлорофиллин - натрия [Э.Н. Бикбов, Jonathan S., 2005]

Экспериментально-теоретическое обоснование применения активированного хлорофилл содержащего препарата для клинического применения при лечении гиперпластических процессов эндометрия

Метод ФИГТ основан на способности фотосенсибилизатора (типа и\или аналога Радахлорофилла-РХ) селективно накапливаться в злокачественных, патологически измененных или пораженных вирусами (микробами) клетках и изменять их структуру и функцию после воздействия на них источника света или лазерного излучения определенной длины волны.

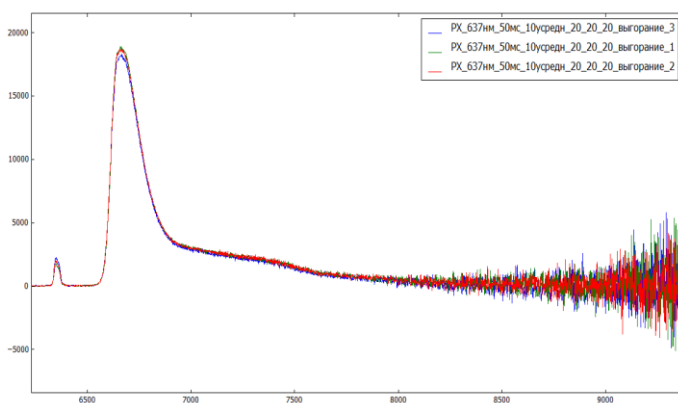


Рисунок 1. Подобраны оптимальные параметры регистрации сигнала (мощность и время экспозиции) для лазера 637 нм, при которых эффект выгорания составляет не более 6% (применяются для диагностики). Показано, что наиболее эффективными длинами волн для возбуждения являются волны – 405 нм и 637 нм (что полностью согласуется с рисунком ниже)

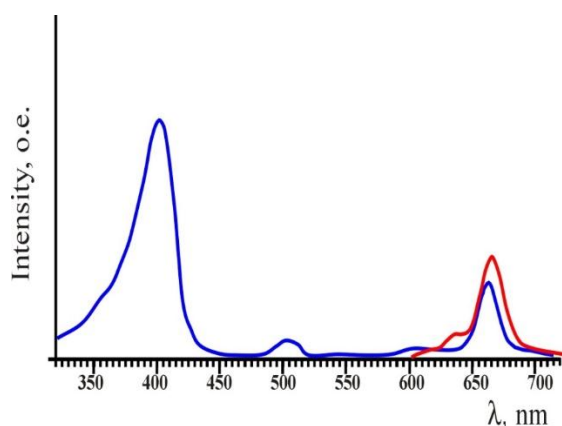


Рисунок 2. Спектры поглощения «Хлорофилл–содержащего препарата».

«Хлорофилл–содержащий препарат[®]» (ХСП) обладает способностью поглощать свет в видимой области, результатом чего является его фото-активация. Последнее приводит к окислительным процессам в биологических тканях, их повреждению и последующему разрушению (некрозу).

Моделирование объемной ФИГТ *in vitro*

Представленные данные теоретически обосновывают предложенную нами инновационную концепцию ФИГТ. – активация фотосенсибилизатора РХ вне организма, что подтверждено в эксперименте (Рисунок 3).

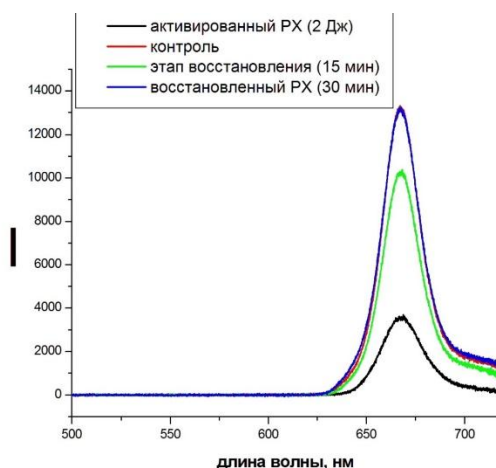


Рисунок 3. Активация и ауто-восстановление амплитудно-спектральных характеристик препарата.

Установлено, что выгорание люминесценции РХ: при поглощении 1 Дж – 5%, при поглощении 3 Дж – 18%, при поглощении 10 Дж – 25%. Установлено, что

увеличение дозы более 30 Дж активность и интенсивность ответной реакции не увеличивает.

Изучение эффекта накопления активированного и не активированного препарата X в органы и ткани животных (мыши)

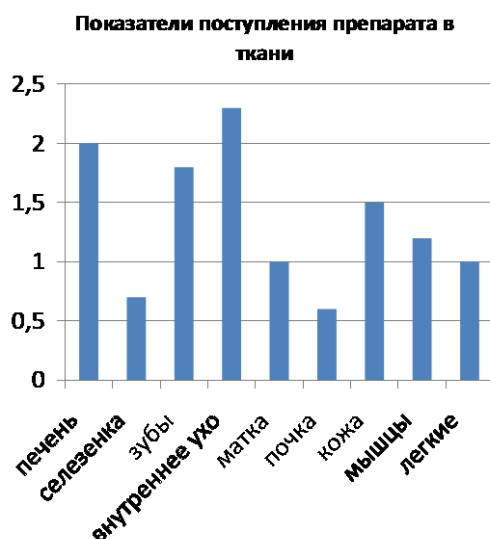


Рисунок 4. Накопление активированного и/или не активированного хлорофилл-содержащего препарата в ткани (мыши).

В эксперименте на животных (мыши) показана реальная возможность активации хлорофилл-содержащего фотосенсибилизатора вне БО и его накопление в органах и тканях (Рисунок 4). Это позволило впервые обосновать методику объемной активированной ФИГТ микрофлоры.

Экспериментальное обоснование эффективности объемной активированной ФИГТ (in vitro)

Для проведения эксперимента были взяты два микроорганизма *Ps. aeruginosa* и *S. aureus*. В качестве основы для эксперимента был взят диско-диффузионный метод, основанный на диффузии антибиотиков и/или РХ из носителя в плотную питательную среду и ингибции роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация используемого препарата обладает бактерицидным действием.

Показана эффективность ФГД активированного препарата на микрофлору (большая зона отсутствия роста микрофлоры вокруг диска с активированным

препаратом 25-30 см). Можно предположить, что взаимодействие активированного ХСП с микробной клеткой схожа, по-видимому, с кислород-зависимой подсистемой и микробоцидной системой фагоцитов, к которой не выявлено привыкания. В отдельном исследовании было показано, что способность фотосенсибилизатора накапливаться в измененных тканях, микробных клетках с реализацией эффекта летальной фото-сенсibilизации бактерий может быть использована при лечении антибиотико-резистентных штаммов патогенных микроорганизмов.

Апробация методики объемной активированной ФИГТ при лечении опухолей (карцинома Эрлиха у мышей)

В исследовании использовали 60 лабораторных мышей (из них 15-контрольная группа). В опытной группе 15 мышей принимали не активированный препарат в разведении 1:10, 15-активированный препарат (активирован максимальной дозой лазерного облучения) в разведении 1:10, в следующей группе 15 мышей принимали аналогичный активированный препарат в разведении 1:1000. Контроль-7 мышей. Прием указанных препаратов осуществляли 2 месяца. Через 2 месяца всем мышам, кроме группы с чистым контролем ввели внутрибрюшинно взвесь культуры клеток карциномы Эрлиха объемом 0.1 мл

Мыши с карциномой- контроль быстро увеличивались в размерах (асцит) и погибали на 4-6 день. Мыши, принимавшие не активированный хлорофилл содержащий препарат или раствор 1:10 H₂O₂ 3% погибали на 6-12 день. Мыши принимавшие активированный препарат в разведении 1:10 жили 21-24 дня, а при его разведении 1:1000-погибали в пределах 10 дней.

Таким образом, доказан антимикробный и противоопухолевый эффект хлорофилл содержащего препарата, активированного вне организма. Представленные исследования явились обоснованием применения активированного РХ в клинике. Кроме представленного эффекта препарат по данным его производителей обладает и фото-иммуноактивирующим действием, что не противоречило концепции лечения гиперплазии эндометрия.

Метод лечения – объемная фото-ингибирующая терапия (ФИГТ)

Объемная ФИГТ с использованием препарата, содержащего активную форму хлорофилла (хлорин E₆) была проведена 88 пациенткам – 45 женщинам с гиперплазией эндометрия и 43 пациенткам с сочетанными формами заболевания –

гиперплазии эндометрия и хроническим эндометритом. Препарат, содержащий хлорин Е-6, принимали дробно в режиме дискретного увеличения дозы от 0.1 мл до 20 мл. Рассчитанный период приема препарата основывался на результатах экспериментального факта накопления препарата в тканях и составлял 12-18 дней. После определения уровня накопления препарата проводили внешнюю активацию фотосенсибилизатора с помощью излучения He-Ne лазера в дозе 100 - 160 мДж в течении 3 минут. В случае рецидивирующего гиперпластического процесса дополнительно на фоне приема препарата per os проводили внутриматочную активацию фото - сенсибилизатора (фото-иммунную и фото-ингибирующую) в дозе 100-160 мДж 3-4 мин, что соответствовало 1,5-2,0 мВт на выходе световода.

Оценку результатов лечения осуществляли через 2-3 недели после его окончания. Контрольную оценку морфофункционального состояния эндометрия производили через 4-6 недель после лечения с использованием гистероскопии, лазерной спектральной конверсионной диагностики и патогистологического исследования.

Статистическая обработка

Все анамнестические, клинические, лабораторные данные были проанализированы с использованием стандартных прикладных программ для статистической обработки «Microsoft Excell – 7,0» версия XP, раздел «Анализ данных», подразделение «Описательная статистика» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» 6,0.

Результаты клинических наблюдений

Были обследованы 108 женщин в возрасте 32-47 лет, которые обратились в клинику с бесплодием с целью реализации репродуктивной функции.

Первая группа в зависимости от морфологического диагноза была разделена на 4 подгруппы в зависимости от морфологического диагноза:

- А. Простая железистая гиперплазия эндометрия без атипии
- Б. Простая железисто-фиброзная гиперплазия эндометрия без атипии
- В. Сложная гиперплазия эндометрия без атипии
- Г. Сложная железисто-фиброзная гиперплазия эндометрия без атипии

Вторая группа была разделена на 2 подгруппы

- А. Простая железистая гиперплазия эндометрия и хроническим эндометритом без атипии

Б. Сложная гиперплазия эндометрия без атипии и хроническим эндометритом

Пациентки с простой и сложной железистой гиперплазией эндометрия с атипией были исключены из исследования. При формировании групп были использованы принципы разделения по морфологическому диагнозу согласно Международной классификации ВОЗ (1980). Распределение больных с учетом морфологической картины эндометрия представлены в таблице №1.

Таблица 1

Результаты гистологического исследования эндометрия

№	Результат гистологического исследования	Количество больных
А	Простая железистая гиперплазия эндометрия без атипии	29
Б	Простая железисто-фиброзная гиперплазия без атипии	12
В	Сложная железистая гиперплазия без атипии	5
Г	Сложная железисто-фиброзная гиперплазия эндометрия без атипии	7
А	Простая гиперплазия и хронический эндометрит	38
Б	Сложная гиперплазия и хронический эндометрит	7

Обследованные пациентки были в возрасте от 28 до 47 лет. Средний возраст женщин: I - $38 \pm 0,7$ лет, II - $41 \pm 0,6$, III - $39 \pm 0,2$ года. Причиной обращения в клинику у всех женщин было *бесплодие*. При этом первичное бесплодие в I группе было у 12 (27,9%), вторичное у 31 (72,0%) женщин. Абсолютное бесплодие – отсутствие маточных труб - было у 3 (6,9%) пациенток I группы и у 2 (4,4%) женщин II группы. Продолжительность бесплодия у женщин: I группы была $3 \pm 0,6$ лет, второй $4 \pm 0,9$ лет. При этом женщины I группы уже имели в анамнезе 3-4 ($3,45 \pm 0,4$) попытки ЭКО и ПЭ, и пациентки II группы – 4-6 ($5 \pm 0,7$) попыток. Выявлена общая тенденция, ведущая к хроническому воспалению, бесплодию и неразвивающейся беременности – 38,7% - искусственные аборты с повторными выскабливаниями.

В результате исследования установлено, что в основной группе 35 из 88 женщин (39,7%) ранее никогда не имели беременности, 53 (60,2%) ранее имели беременности, при этом роды были только у 26 (29,5%). У остальных 62 (70,4%) пациенток были самопроизвольные выкидыши и неразвивающиеся беременности. 67

(76, 1%) женщины не предъявляли каких-либо жалоб кроме отсутствия беременности, остальные 21 (23, 8%) – жаловались на скудные менструации в течение 1-3 дней, возникшие в последние 1-3 года. В анамнезе обращает на себя внимание высокая частота диагностических и вынужденных выскабливаний матки, связанных с прерыванием беременности 61 (69, 3%).

При ультразвуковом исследовании локальное увеличенное М-эхо от 10 до 15 мм было обнаружено у 32 (47, 1%), у остальных 36 (52, 9%) имела место неравномерная эхогенность эндометрия при явной его «гипоплазии», у 23 (26, 1%) из них эндометрий был тонкий 4 -7 мм. При доплерометрии у 8 женщин кровотока в сосудах матки были в пределах нормы. У 77 пациенток (87, 5%) были выявлены нарушения гемодинамики различной степени.

Допплерометрическое исследование кровотока в восходящей ветви маточной артерии, а также в аркуатных, радиальных, базальных и спиральных артериях выявило отклонения от нормальных значений у 83 (94, 3%). Определялось «обеднение» сосудистого рисунка с уровня радиальных артерий у 21 пациенток (23, 9%) а также сигналов от базальных и спиральных артерий у 18 (20, 5%) пациенток.

В результате бактериологического обследования рост условно патогенной флоры был обнаружен у 20 (22, 7%) женщин. Наибольшее присутствие было у *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Enterococcus* и *Enterococcus faecalis*. У этих же пациенток были идентифицированы цитологические изменения клеток экто- и эндоцервикса, присущие дисплазии I и II степени воспалительного генеза.

При минигистероскопическом исследовании очевидные признаки гиперплазии – полипы, очаговые фокусы гиперплазии были выявлены только у 34 (38, 6%) пациенток. У всех остальных была картина неравномерно утолщенного эндометрия при средней его гипотрофии, одиночные и мультифокусные очаги гиперваскуляризации и ультра-мелкие сосочковые выросты. У подавляющего большинства женщин – 57 (64, 8%)- имели место признаки хронического эндометрита - очаговые и диффузные крупно- и мелкоочаговые геморрагии, а также фиброзные изменения и синехии как в цервикальном канале, так и в полости матки.

В результате патоморфологического исследования у 45 (50, 1%) женщин имелся морфологически верифицированный диагноз: хронический эндометрит, у 17 (25, 0%) - признаки гормональной дисфункции и один из вариантов гиперплазии

эндометрия. Одновременно были верифицирована гиперплазия эндометрия у 43 (48, 7 %): железистые полипы эндометрия у 21 (23, 9%) женщин, железисто-фиброзные полипы эндометрия у 6 (6, 8%), простая гиперплазия эндометрия без атипии – у 9 (10, 2%) пациенток, сложная гиперплазия эндометрия без атипии у 4 (4, 5%).

Иммуногистохимическое исследование (у 21 пациентки) показало, что у всех женщин были явные признаки нарушения рецептивности эндометрия как в I, так и во II фазу менструального цикла, а именно снижение коэффициента Pg/ER до 1, 2-1, 6 при норме 2-4, снижение экспрессии LIF на 50-60 %, повышение CD 56 в 1, 5 раза, что свидетельствовало об увеличении NK-клеток в строме эндометрия. Установлено, что средний уровень экспрессии ER- α в эпителии желез у женщин с ПГЭ на фоне хронического эндометрита составил 6, 0 \pm 0, 7 балла Allred Score и был ниже, чем в контрольной группе, средний уровень PR в эпителии желез составил 5, 1 \pm 0, 9 балла Allred Score ($p < 0, 05$). У женщин со сложной гиперплазией эндометрия (СГЭ) на фоне хронического эндометрита уровень экспрессии ER α в эпителии желез составил 7, 3 \pm 0, 8 балла, а уровень PR - 6, 7 \pm 1, 8 балла Allred Score, что также отличалось от показателей группы сравнения. Кроме того, отмечено, что у 18 из 21 (85, 71%) женщин имело место неравномерное распределение ER- α и/ или PR. Определялись зоны с резким обеднением рецепторного аппарата ER- α как при ПГЭ, так и при СГЭ на фоне ХЭ. Количество пиноподий было 25-30%.

Таким образом, ведущим в нарушении рецептивности эндометрия у женщин с гиперплазией эндометрия на фоне хронического эндометрита было преимущественное снижение коэффициента рецептивности за счет повышения экспрессии рецепторов к ER при снижении экспрессии 5 PgR и LIF на 40-50% и превышении клона CD56 –положительных лимфоцитов в 1, 5 раза.

Результаты флюоресцентной диагностики пациенток с хроническим эндометритом и гиперплазией эндометрия (ХЭ и ГЭ) - особенности и информативность

Флюоресценция нормального эндометрия (пролиферативная активность) составила 6-8 \times 10⁷-10⁸ отн. ед. (ОЕ). Причем в первую фазу цикла-5-6 \times 10⁷ в 5-6 степени в отн. ед. (10-15 день цикла) и 6-8 \times 10⁷-10⁸ отн. ед. на 20-25 день цикла (в среднем). Индекс азробности у женщин в норме составил в среднем 1. 2-1. 7 отн. ед. У женщин с хроническим эндометритом до лечения флюоресценция эндометрия

составила $5-8 \times 10^{5-6}$ отн. ед., а показатели аэробности $0,7 - 1,08$ ($0,92 \pm 0,04$) ОЕ, после лечения - $1,1 - 1,7$ ($1,50 \pm 0,18$) ОЕ, что соответствовало норме и были на 5-10% выше, что соответствовало положительной конверсии. При хроническом эндометрите наблюдалась обратная картина (отрицательная конверсия). Структурированность тканей эндометрия в норме (метаболическая - аэробность и морфометрическая - уровень пролиферативной активности эндометрия во все трех исследуемых зонах эндометрия) была хорошо выражена в норме и не соответствовала таковой у пациенток с ХЭ и ГЭ. Интенсивность пролиферативной активности эндометрия по показателям интенсивности флюоресценции была снижена у пациентов с ХЭ и ГЭ и составляла $2-7 \times 10^6$ ОЕ, что соответствовало 5-6 дню менструального цикла (при исследовании на 22-24 день) цикла, за исключением участков с гиперпластическим процессом, где она составляла до $8-9 \times 10^{10}$ отн. ед. Микроциркуляция поверхностных слоев эндометрия (по показателям обратно отраженного зондирующего лазерного излучения) была снижена на 30-50% ($1,04 \pm 0,03$) и нормализовалась на фоне лечения так же, как и пролиферативная активность (ОЕ) и структурированность тканей (метаболическая и морфометрическая) во всех точках полости матки.

Полученные при ЛКД данные (флюоресцентная составляющая) показали, что проявления ГЭ эндометрия характеризуются увеличением интенсивности сигнала флюоресценции в 2-10 раз в различных её отделах (дно, середина, внутренний зев), некоторым сдвигом сигнала пика флюоресценции на 5-10 нм вправо (у 25-30% пациенток), нарушением спектральной структурированности практически у всех пациенток. Это сопровождалось высокой пролиферативной активностью клеток эпителия. При этом показатели аэробности и микроциркуляции в эндометрии были снижены практически во всех отделах матки на 25-55%. В процессе реабилитационных мероприятий все представленные показатели практически нормализовались.

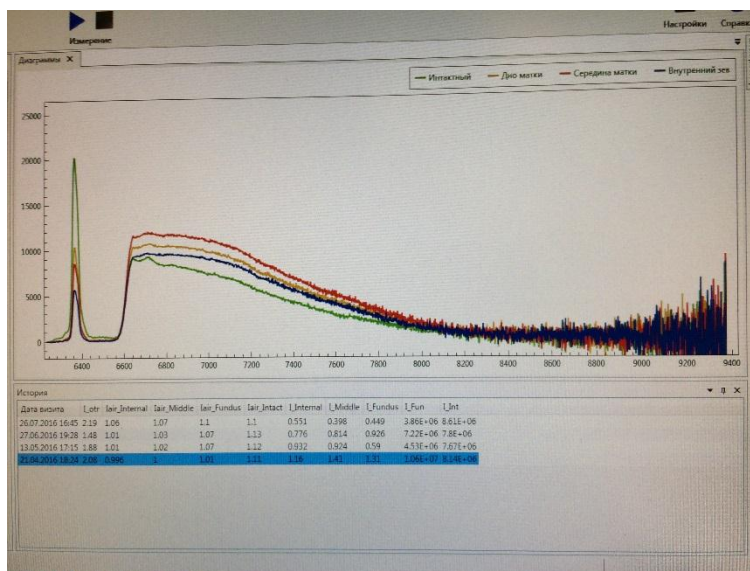


Рисунок 5. Пример спектрограммы у пациентки с хроническим эндометритом до ФИГТ (15 д. ц.).

В результате морфологического исследования признаки гиперплазии эндометрия не выявлены ни у одной пациентки. В I фазе цикла признаки ранней и средней пролиферации без лимфоцитарной инфильтрации были у 72 (81,8%) женщин, у остальных имелись нерезко выраженные признаки хронического воспаления – преимущественно слабо выраженная очаговая лимфоцитарная инфильтрация стромы.

Иммуногистохимическое исследование показало увеличение PgR в клетках эндометрия до 92% у 15 (71, 4%) и ER – до 88 % у 6 (28, 6%) пациенток, что соответствовало 8-9 и 7-8 баллам (Allred Score), восстановление LIF до 7-9 баллов, CD 56 до 8-10 у 14 (66, 7%) женщин и CD 138 – 0 в поле зрения у 16 (76, 2%) пациенток.

Результаты лазерной флуоресцентной конверсионной спектрометрии

После фото-ингибирующей терапии (Рисунок 4.) спектральная интенсивность всех отделов матки были структурированы. После лечения показатели метаболизма, пролиферации и микроциркуляции вернулись к норме у 76 (86, 4%) женщин, стали лучше у 34 (38, 6%), незначительные изменения у 18 (20, 5%).

Индекс аэробности у женщин с хроническим эндометритом после ФИГТ составил 1. 1-1. 7 (1, 56±0, 05) ОЕ, (0, 7 - 1, 08 (0, 92±0, 04) ОЕ до лечения). Микроциркуляция поверхностных слоев эндометрия нормализовалась на фоне лечения так же, как и структурированность тканей во всех точка полости матки, составив 1, 58±0, 03 (норма 1. 5-2. 0). Исследуемые амплитудно-спектральные показатели выравнивались практически во всех отделах матки.

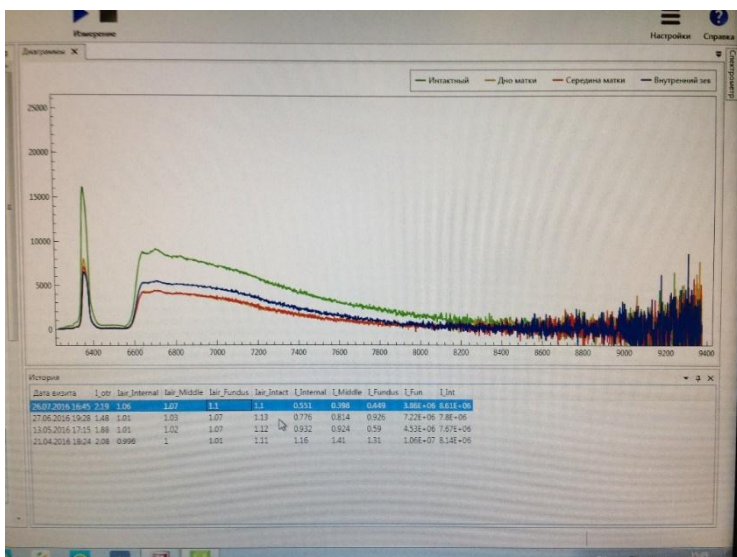


Рисунок 6. Пример спектрограммы у пациентки с хроническим эндометритом и ГЭ после ФИГТ и ФИТ.

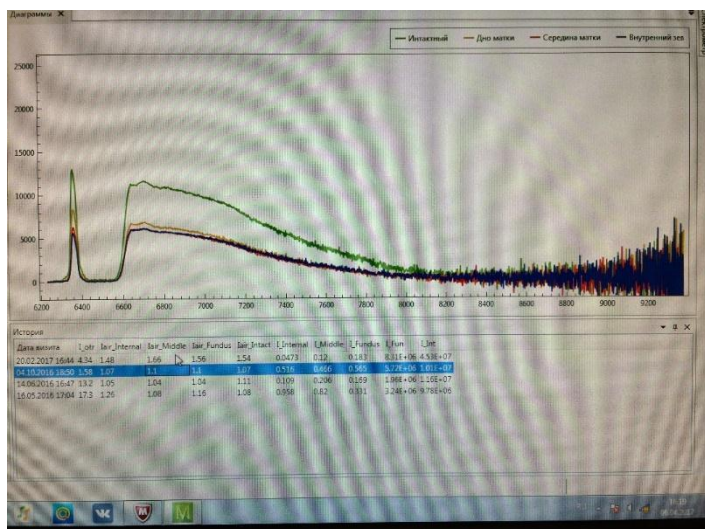


Рисунок 7. Спектрограммы у пациентки с гиперплазией эндометрия после ФИГТ.

Таким образом, использование лазерной конверсионной экспресс-диагностики и объемной фото-ингибирующей и фото-иммунной (комплексной фото-ингибирующей и фото-иммунной) терапии позволило восстановить морфофункциональное состояние эндометрия. Восстановление рецепторного аппарата эндометрия и гемодинамики в виде нормализации показателей кровотока на уровне радиальных артерий.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая комплексная лечебно-диагностическая медицинская технология, основанная на применении лазерной конверсионной экспресс-диагностики (флуоресцентная составляющая) и объемной, активированной вне организма фото-

ингибирующей терапии гиперпластических процессов эндометрия с использованием безопасных хлорофилл содержащих препаратов.

2. Разработанная методика позволяет объективно выявлять нарушение структурно-функциональных характеристик эндометрия при гиперпластических и воспалительных процессах (клеточная пролиферация, оксигенация тканей, нарушение структурированности и их морфо-метаболических характеристик) и их восстановление при использовании объемной фото-иммунной терапии.

3. Установлены особенности клинической картины гиперплазии эндометрия и гиперплазии в сочетании с хроническим эндометритом у женщин старшего репродуктивного возраста. Это – отсутствие клинических проявлений и меноррагии, несоответствие эхографической картины гистероскопической. Объективным критерием состоятельности эндометрия при бесплодии и подготовки к ВРТ является гистероскопия и лазерная конверсионная диагностика.

4. Информативными показателями нормального эндометрия являются: пролиферативная активность клеток, аэробность (оксигенация), интенсивность микроциркуляции, структурированность. Флюоресценция нормального эндометрия (пролиферативная активность) составила $6-8 \times 10^7-10^8$ отн. ед. (ОЕ). Индекс аэробности - $1.3-1.7$ ($1,58 \pm 0,08$) ОЕ. Интенсивность микроциркуляции - $1,41-1,54$ ($1,47 \pm 0,07$). Структурированность тканей эндометрия в норме была выражена и составила $1,5-2,0$ ОЕ. При хроническом эндометрите индекс аэробности составил $0,7-1,1$ ($0,9 \pm 0,1$), интенсивность микроциркуляции $1,0-1,2$ ($1,1 \pm 0,04$), структурированность отсутствовала.

5. Показатели лазерной конверсионной диагностики при гиперплазии эндометрия характеризуются увеличением интенсивности флюоресценции в 2-10 раз в разных отделах эндометрия со сдвигом ее пика (у 30% пациенток) на 5-10 нм. При этом показатели аэробности во всех отделах полости матки были снижены на 25-65%.

6. Клиническая эффективность лечения гиперплазии эндометрия методом объемной фото-иммунной терапии составила 86,7% и выражалась в нормализации в эндометрии пролиферации, микроциркуляции, оксигенации и уровня метаболизма. При ЛКД эти показатели вернулись к норме у 66,7% женщин, улучшились у 28,2%, незначительные изменения отмечены у 5,1%% пациенток.

Индекс аэробности у женщин с хроническим эндометритом и гиперплазией после ФИГТ составил 1.1-1.7 ($1,56\pm 0,05$) ОЕ, микроциркуляция поверхностных слоев эндометрия $1,58\pm 0,03$ ОЕ.

7. Объемная фото-иммунная терапия способствовала восстановлению кровоснабжения в сосудах матки у 84,4% женщин (верифицировано доплерометрией), и улучшению рецептивности эндометрия у 69,1 % пациенток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Показанием для лазерной конверсионной диагностики является подозрение на гиперпластический процесс эндометрия как при наличии клинических признаков проявления, так и без них, при наличии УЗИ критериев. ЛКД является методом выбора для экспресс-диагностики хронического эндометрита и гиперплазии эндометрия у женщин с бесплодием как в условиях ВРТ, так и без его применения.

2. Лазерную конверсионную диагностику целесообразно производить в пределах I и II фазы одного менструального цикла. Условием для диагностики является отсутствие менструального и межменструального кровотечения, гарантия отсутствия беременности.

3. Показанием для лазерной фото-ингибирующей и фото-иммунной терапии является гиперплазия эндометрия, хронический эндометрит, (в изолированном варианте или в сочетании), в том числе как в условиях проведенной ранее гормональной терапии и при ее неэффективности, так и при наличии противопоказаний к таковой.

4. Критерием назначения ФИГТ являются снижение параметров оксигенации, пролиферации и микроциркуляции в поверхностных слоях эндометрия на 10-25%.

5. Оптимальной продолжительностью перорального приема хлорофилл содержащих препаратов до начала ФИГТ можно считать 12-14 дней, что определяется лазерной спектроскопией повышением уровня оксигенации на 5-10%.

6. Оптимальными параметрами внутриматочного облучения эндометрия при ГЭ следует считать 2 Дж, время облучения 2 мин. При изолированной форме хронического эндометрита 80-120 Мдж в течение 3 мин. При сочетанных вариантах – последовательно 2 Дж и 120 Мдж/ 2-4 мин. Интервал между сеансами 3-6 дней.

7. Контроль за эффективностью лечения следует проводить не ранее 4-6 недель после окончания ФИГТ.

8. Сочетанную, локальную и объемную ФИГТ следует проводить у женщин с бесплодием в программах ВРТ (так и без них) в случаях с рецидивирующим течением и при неэффективности ранее проведенного консервативного гормонального или иного лечения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Е.А.Калинина, М.Т.Александров, **Ю.И. Пиманчева** Несостоятельный эндометрий в программах ЭКО: патогенез, диагностика и реабилитация.(тезисы) // Материалы XXV Юбилейной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра», Сочи, 2015, С. 2.
2. М.Т.Александров, В.И.Кукушкин, Е.А.Калинина, А.И.Ищенко, Т.А.Джибладзе, **Ю.И. Пиманчева** Применение раман-люминесцентных технологий в восстановлении фертильности у женщин.(статья) // Сборник научных трудов «Биомедицина XXI века: достижения и перспективные направления развития», 2016, С.-126-141
3. **Ю.И. Пиманчева**, В.М.Зуев, М.Т.Александров, Е.П.Пашков Разработка метода объемной активированной фотодинамической терапии заболеваний и процессов микробной и неопластической природы на основе использования раман-флюоресцентной технологии. (статья) // Сборник статей по материалам XVI международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки XXI века», Москва, 2016, С - 42-53.
4. М.Т.Александров, В.М.Зуев, **Ю.И. Пиманчева**, Е.П.Пашков, Г.Э.Баграмова Обоснование применения метода объемной активированной фотодинамической терапии заболеваний и процессов микробной и неопластической природы в клинической гинекологии (статья) // Ж. «**Архив акушерства и гинекологии имени В.Ф. Снегирева**», 2017, №4, т.4, С.-194-201
5. М.Т.Александров, **Ю.И. Пиманчева**, Е.А.Калинина, Т.А.Джибладзе, А.М.Гринева, Г.Э.Баграмова Лазерная конверсионная экс-пресс-диагностика и объемная фотоактивная терапия гиперпластических процессов эндометрия. (статья) // Ж. «**Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии**», 2017, т. 16, №2, С. 5-11
6. **Ю.И. Пиманчева**, М.Т.Александров, Е.А.Калинина, В.И.Кукушкин, Т.А.Джибладзе Реабилитация эндометрия в программах ЭКО.(тезисы) // Материалы XI международного конгресса по репродуктивной медицине, 2017, С.-432-433
7. М.Т.Alexandrov, Е.А.Kalinina, А.I.Ischenko, Т.А.Dzhibladze, I.D. Khokhlova, **Y.I.Pimancheva** Evaluation of fluorescent rapid diagnosis of the endometrium in the complex preparation for pregnancy and program IVF. (тезисы) // 17th World congress of the Academy of Human Reproduction, 15-18 March 2017, Rome, Italy – Abstracts.
8. V.M.Zuev, M.T.Alexandrov, E.A.Kalinina, **Y.I.Pimancheva** A.I.Ishchenko, T.A.Dzhibladze, I.D.Khokhlova, A.D.Osipova Laser converse express-diagnostics and volumetric photodynam-ic therapy in women with infertility in ART programs.

- (тезисы) // 12th Congress of the European society of gynecology, 18-21 October 2017, Barcelona, Spain.
9. V. Zuev, A. Osipova, A. Ischenko, T. Djibladze, I. Kchochlova, **Y. Pymancheva** the value of express laser spectroscopy in the diagnosis of the uterine abnormalities in perimenopausal women // The 18th world congress “Gynecological Endocrinology”, 7-10 march 2018, Firenze, Italy.
 10. В.М. Зуев, Т.А. Джибладзе, М.Т. Александров, Е.А. Калинина, А.И. Ищенко, **Ю.И. Пиманчева**, А.Д.Осипова Эффективность фототерапии в регенерации атрофического эндометрия в программах ВРТ. Отдаленные результаты. (тезисы) // Материалы XII Международного конгресса по репродуктивной медицине, Москва, 16-19 января 2018 г., С. 546-547
 11. V. Zuev, T.Dzhibadze, A. Ischenko, I.Khokhlova, **Y.Pimancheva**, A.Osipova regeration of atrophic endometrium in art programs. Effect of phototherapy. Long-term results // The 18th world congress “Gynecological Endocrinology”, 7-10 march 2018, Firenze, Italy.