**ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России**

**(Сеченовский Университет)**

**Кафедра акушерства и гинекологии №1**

**Клиническое значение экспресс-диагностики доброкачественных заболеваний эндометрия с применением лазерного излучения.**

Автор Пиманчева Ю.И.

Научный руководитель д.м.н., профессор Зуев В.М.

Москва, 2017

***Актуальность***

Доброкачественные заболевания эндометрия воспалительного, дисгормонального и неопластического характера–гиперплазия эндометрия, хронический эндометрит, гормональная дисфункция эндометрия- занимают важное место среди женских болезней. Частота их высока (9-36%) , они часто сопровождаются кровотечениями, приводят к бесплодию и снижению качества жизни, повышают риск развития рака эндометрия, что является актуальной медико-социальной проблемой.

Гиперплазия эндометрия, хронический эндометрит, сопутствующая, гормонально обусловленная функциональная несостоятельность эндометрия, являются частой причиной нарушения имплантации плодного яйца в естественных менструальных циклах и программах ВРТ, остановки развития беременности на ранних сроках (неразвивающейся беременности) и самопроизвольному выкидышу.

***Диагностика***

Современные методы диагностики патологии эндометрия - УЗИ, гистероскопия, биопсия и патоморфологическое исследование широко известны. Объектом исследования является ткань эндометрия которая в большинстве случаев получают , по-прежнему, получают путем выскабливания. Данный метод является травматичным, активирует воспаление и оказывает выраженное отрицательное воздействие на морфо-функциональное состояние эндометрия и репродуктивную систему в целом.

В последние годы разработаны и внедрены в медицинскую практику экспресс-методы лазерной конверсионной диагностики (ЛКД) . Метод основан на регистрации спектров свечения, возникающих при неупругом столкновениях световых квантов (фотонов) с нейтральными молекулами исследуемого вещества.

Оптические методы ЛКД диагностики (люминесцентная и рамановская составляющие)  отличаются высокой информативностью, высокой чувствительностью и специфичностью и, главное –неинвазивностью. Разработанные в последние годы  комплексы обладают спектральным разрешением не более 1Å, что в 60-80 раз лучше существующих отечественных и зарубежных аналогов, а так же в 1000 раз чувствительнее прежних методик. Лазерная флюоресцентная диагностика успешно применяется в хирургии, стоматологии, дерматовенерологии. Известны отдельные исследования и в гинекологии, однако конверсионная спектральная диагностика в качестве оптической биопсии эндометрия до настоящего времени не применялась. Не применялась также для лечения гиперплазии эндометрия и фотодинамическая терапия.

***Цель исследования***

Определение возможностей,  оценка клинической эффективности лазерной  конверсионной спектроскопии для экспресс-диагностики гиперпластических процессов эндометрия у женщин с бесплодием в программах ВРТ и повышение эффективности их лечения с помощью лазерной объемной фото-динамической  терапии.

***Задачи исследования***

1. Разработать концепцию лазерной конверсионной экспресс-диагностики, дизайн её экспериментально-теоретического обоснования и клинического применения.
2. Изучить клиническую картину гиперпластических процессов эндометрия (ГПЭ) у женщин с бесплодием в программах ВРТ старше 30 лет.
3. Определить информативные показатели ЛКД флюоресценции нормального и патологически измененного  эндометрия при гиперпластических процессах у женщин с  бесплодием в возрастной категории старше 30 лет.
4. На основе применения ЛКД технологий (раман и флюоресцентная составляющая) экспериментально обосновать медицинскую технологию объемной ФДТ с применением хлорофилл содержащего препарата.
5. Разработать клинический метод объемной лазерной фото-динамической терапии для лечения ГПЭ у женщин с бесплодием в программах ВРТ
6. Оценить клиническую эффективность разработанных методов экспресс-диагностики и объемной  фотодинамической терапии гиперплазии эндометрия и хронического эндометрита у женщин с бесплодием.

***Научная новизна***

* Разработан метод лазерной конверсионной экспресс-диагностики воспалительных и гиперпластических процессов эндометрия
* Впервые изучены спектральные характеристики различных изолированных форм гиперплазии эндометрия и в сочетании с хроническим эндометритом у женщин с бесплодием.
* Определена роль гиперплазии эндометрия, хронического эндометрита и гормональной дисфункции в патогенезе «рефрактерного» эндометрия у женщин с бесплодием старшего репродуктивного возраста, участвующих в программах ВРТ.
* Разработан метод объемной фотодинамической терапии для лечения женщин с гиперпластическими процессами эндометрия, планирующих беременность.
* Произведена оценка эффективности лазерной конверсионной экспресс-диагностики гиперпластических процессов эндометрия у женщин в программах ЭКО

***Практическая значимость***

* Разработана и внедрена в практику не инвазивная лазерная конверсионная экспресс-диагностика воспалительных и гиперпластических процессов эндометрия, позволяющая проводить мгновенную «оптическую» биопсию с высокой степенью корреляции с гистологическим исследованием. Определены спектрометрические характеристики различных форм гиперпластических процессов. 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, от стадии хронического эндометрита
* Разработан и внедрен в практику высокоэффективный негормональный метод лечения ГПЭ и хронического эндометрита, основанный на объемной фотодинамической терапии с применением безопасных природных хлорофилл содержащих препаратов.

***Положения выносимые на защиту***

* Лазерная конверсионная экспресс-диагностика и фото-активная терапия гиперпластических и воспалительных процессов эндометрия на основе лазерной флюоресцентной спектроскопии являются объективными и патогенетически обоснованными.
* Использование лазерной конверсионной экспресс-диагностики позволяет повысить эффективность выявления и лечения гиперплазии эндометрия на фоне хронического эндометрита и обеспечить мониторинг лечения, что в программах ВРТ реализуется в оптимизации выбора времени переноса эмбриона
* Фотодинамическая терапия обеспечивает восстановление механизмов восстановления структуры и функции эндометрия для обеспечения имплантации и способствует благоприятному течению беременности.

***Пациенты***

* Проведено обследование и лечение 88 пациенток в возрасте   30-47  лет с первичным и вторичным  бесплодием и различными формами гиперплазии эндометрия и в сочетании с хроническим эндометритом. Все женщины проходили плановое  обследование перед программой ЭКО и ПЭ. Группу сравнения составили 20 здоровых женщин, которые готовились к ВРТ и  у которых не было беременностей по социальным причинам.
* Критерии включения в исследование : 1) возраст пациенток от 30 до 47 лет,   2) морфологически подтвержденный диагноз  - полипы эндометрия, простая гиперплазия без атипии  или с атипией, 3) сложная гиперплазия эндометрия без атипии  или с атипией, сочетание гиперплазии эндометрия с хроническим эндометритом, бесплодие и участие в программах ВРТ.
* Критерии исключения из исследования: рак эндометрия, наружный генитальный эндометриоз, опухоли яичников,  острый эндометрит .

***Объект исследования***

* ***Группа 1 «Гиперплазия эндометрия» n = 43***
* ***Группа 2 «Гиперплазия эндометрия и хронический эндометрит» n = 45***
* ***Группа 3 «Здоровые при отсутствии патологии эндометрия» n = 20***

***Методы исследования***

* Лазерная конверсионнная диагностика, флюоресцентная спектроскопия
* Ультразвуковое исследование, допплерометрия, цветовое допплеровское картирование.
* Бактериологические исследование и ПЦР(по классическим общепринятым методикам)  - диагностика инфекций,  передающихся половым путем.
* Цитологическое исследование материала  с поверхности шейки матки и эндоцервикса
* Диагностическая минигистероскопия, биопсия эндометрия, по показаниям раздельный кюретаж эндоцервикса и эндометрия с последующим гистологическим исследованием материала,    
  Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с использованием стандартных наборов моноклональных антител.

***Лазерная конверсионная спектроскопия***

Метод экспресс-анализа биологических объектов-микроорганизмов, клеток, тканей

— метод неупругого рассеяния света, —

обеспечивает спектральный «отпечаток» органической молекулы- за 1 сек.

***Клиническая характеристика пациенток***

47 из 88 женщин (53,4%) ранее никогда не имели беременности, 41 (66,3%) ранее имели беременности, при этом роды были только у 12(13,6%). У остальных 35 (39,8%) пациенток были самопроизвольные выкидыши и неразвивающиеся беременности (1-3). 62 (70,5%) женщины не предъявляли каких-либо жалоб кроме отсутствия беременности, остальные 26 (29,5%) – жаловались на скудные менструации в течение 1-3 дней возникшие в последние 1-3 года. высокая частота диагностических и вынужденных выскабливаний матки, связанных с прерыванием беременности- 77 (87,5%) или с эвакуацией не развивающегося плодного яйца

***УЗИ***

При ультразвуковом исследовании локальное увеличенное М-эхо от 10 до 15 мм было обнаружено только у 32 (36,4%), у остальных 56 (63,6%) имела место неравномерная эхогенность эндометрия при явной его «гипоплазии», у 66 (75,0%) из них эндометрий был тонкий 4-7 мм. При допплерометрии у 23 женщин кровотоки в сосудах матки были в пределах нормы. У 65 пациенток (73,8%) были выявлены нарушения гемодинамики различной степени.

***Допплерометрия***

* Допплерометрическое исследование кровотока в восходящей ветви маточной артерии, а также в аркуатных, радиальных, базальных и спиральных артериях выявило отклонения от нормальных значений у 77 (87,5%) обследованных. Отмечались нарушения различной степени выраженности . У 31 (35,2 %) пациенток отмечалось значительное повышение сосудистого сопротивления с нулевым диастолическим компонентом на уровне восходящих ветвей маточных артерий, однако не было отмечено прямой корреляции с показателями кровоснабжения на уровне более мелких их ветвей.
* У 34 пациенток (38,6 %) отмечалось значительное повышение сосудистого сопротивления на уровне радиальных артерий, а базальные и спиральные артерии не картировались вовсе или картировались единичные сосуды с венозным спектром.
* Определялось «обеднение» сосудистого рисунка вплоть до отсутствия сигналов с уровня радиальных артерий у 21 пациенток (23,9%) а также сигналов от базальных и спиральных артерий у 28 (31,8%) пациенток.

***Минигистероскопия***

При мини-гистероскопическом исследовании очевидные признаки гиперплазии – полипы, очаговые фокусы гиперплазии были выявлены только у 35 (39,7%) пациенток. У всех остальных была картина неравномерно утолщенного эндометрия при средней его гипотрофии, одиночные и мульти-фокусные очаги гиперваскуляризации и ультра-мелкие сосочковые выросты. У подавляющего большинства женщин 74(84,1%) имели место признаки хронического эндометрита - очаговые и диффузные крупно- и мелкоочаговые геморрагии а также фиброзные изменения и синехии как эндоцервиксе, так и в полости матки.

***Патоморфология***

В результате патоморфологического исследования у 66 ( 75,0%) женщин имел морфологически верифицированный диагноз: хронический эндометрит, у 22 (25,0%) - признаки гормональной дисфункции и один из вариантов гиперплазии эндометрия. Среди морфологических признаков воспаления были: умеренно выраженная и выраженная лимфо- и лейкоцитарная инфильтрация эпителия и стромы, отек стромы, некроз и фиброз стромы эндометрия. Одновременно были верифицированы: железистые полипы эндометрия у 27 (30,7%) женщин, железисто-фиброзные полипы эндометрия у 8 (9,1%), простая гиперплазия эндометрия без атипии – у 11 (12,5%) пациентокα, сложная гиперплазия эндометрия без атипии у 6 (6,8%) и сложная атипическая гиперплазия эндометрия у 5 пациенток.

***Иммуногистохимия***

Иммуногистохимическое исследование ( у 21 пациентки) показало, что у всех женщин были явные признаки нарушения рецепторности 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. При этом у 12 (57,14%) пациенток имело место снижение экспрессии как ER- α , так и PR рецепторов, а у 9(42,86%) женщин только PR. Установлено, что средний уровень экспрессии ER-α в эпителии желез у женщин с ПГЭ на фоне хронического эндометрита составил 6,0+0,7 балла Allred Score и был ниже, чем в контрольной группе; средний уровень PR в эпителии желез составил 5,1+0,9 балла Allred Score (p<0,05). У женщин со сложной гиперплазией эндометрия (СГЭ) на фоне хронического эндометрита уровень экспрессии ERα в эпителии желез составил 7,3+0,8 балла, а уровень PR -6,7+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%.

***Лазерная конверсионная диагностика***

Флюоресценция нормального эндометрия (пролиферативная активность) составила 1.2-1,7 (1,53±0,03) относительных единиц (ОЕ), при морфологических нарушениях, характерных для хронического эндометрита - 0,9-1,1 (1,09±0,3) (по отношению к её интенсивноти в интактной ткани кожи при норме свыше 1,4 ОЕ). Индекс аэробности у женщин с хроническим эндометритом до лечения составил 0,7 - 1,08 (0,92±0,04) ОЕ, после - 1.1-1.7 (1,58±0,08) ОЕ. Интенсивность пролиферации составляла 0,109-0,206 (0,138±0,09) Индекс пролиферации был снижен и составлял 1,96±0,6, что соответствовало 5-6 дню менструального цикла при исследовании на 22-24 день цикла. Микроциркуляция поверхностных слоев эндометрия была снижена на 30-80% (1,04±0,03) и нормализовывалась на фоне лечения так же, как и структурированность тканей во всех точка полости матки, составив Исследуемые амплитудно-спектральные показатели были практически равны.

***ЛКД***

Полученные данные при ЛКД (флюоресцентная составляющая) показали,что проявления ГЭ эндометрия характеризуются увеличением интенсивности сигнала флюоресценции в 2-10 раз в различных ее отделах (дно ,середина,внутренний зев), некоторым сдвигом сигнала пика флюоресценции на 5-10нм вправо (у 25-30% пациентов),нарушением спектральной структурированности практически у всех пациенток. Это свидетельствовало о высокой пролиферативной активности клеток эпителия. При этом показатели аэробности и микроциркуляции в эндометрии были снижены практически во всех отделах матки на 25-65%. В процессе реабилитационных мероприятий все представленные показатели нормализовались.(см.рис. 2-4).

***Методом лечения явилась о***бъемная фото-активная (фотодинамическая )

терапия с использованием природных хлорофилл содержащих препаратов

***Лечение  
(концепция применения хлорофилла [Хлорин E-6])***

***Концепция лечения*:** Повышение интенсивности аэробного метаболизма тканей эндометрия, их микроциркуляции, нормализация пролиферативной активности, противовоспалительное и иммуномодулирующее воздействие

***Критерии оценки*:** повышение индекса аэробности тканей, увеличение интенсивности кровотока поверхностных слоев эндометрия по показателям степени уменьшения обратно отраженного сигнала лазерного излучения и их структурированности (совпадают по спектру и его интенсивности в области дна, середины ,внутреннего зева эндометрия).

Нормализация пролиферативной активности тканей эндометрия и их морфо-функциональной структурированности по показателям увеличения интенсивности их флюоресценции и аэробности (совпадают по спектру и его интенсивности в области дна, середины, внутреннего зева матки) .

***Результаты лечения***

Анализ клинических данных после проведенной ФДТ показало, что у большинства пациенток 59( 86,76%) изменился характер менструаций – удлинился период от 2 до 3,5-4 дней, увеличился объем менструальной кровопотери при прежней скудной , изменилась цветовая менограмма, свидетельствовавшая в пользу физиологической (обеспечивая физиологическую ишемию , сепарацию и десквамацию эндометрия).

***Результаты УЗИ***

* Ультрасонография показала соответствие эхографической картины эндометрия фазе менструального цикла у 54 (79,41%) женщин. Особого внимания заслуживают изменения в сосудистом русле матки, обнаруженные при допплерометрическом исследовании .
* Следует отметить , что максимальные изменения показателей кровотоков были зафиксированы на уровне радиальных артерий. Из 32 пациенток с предшествующими нарушениями кровоснабжения на этом уровне у 27 (84,37%) отмечено возвращение показателей к нормальным значениям ( так средний показатель индекса резистентонсти IR изменился от 0,94 до 0,68 !!! ).

***Допплерометрия после ФДТ***

Из 18 пациенток с отсутствием сигналов от базальных и спиральных артерий только у 12 была отмечена положительная динамика .Однако стоит отметить , что эхографическая оценка сосудов субэндометриальной зоны и эндометрия представляет определенные трудности и является более операторзависимой, нежели оценка зоны радиальных артерий. Повышение сосудистого сопротивления в бассейне ветвей маточных артерий может являться критерием включения пациенток в программу с использованием ФДТ. Сосудистый статус рассматривался как показатель эффективности проводимой терапии и фактор прогноза последующей успешной имплантации.

***Минигистероскопия***

Эндоскопическим контролем служила (офисная) минигистероскопия, выполненная на 5-7 день менструального цикла. Получены следующие результаты. Признаки гиперплазии не обнаружены ни у одной пациентки. Вместе с тем, эндометрий без признаков воспаления и атипии был выявлен у 55(86,4%), неравномерно утолщенный в разных отделах полости матки эндометрий, (что было расценено как персистирующее хроническое воспаление и дисфункция эндометрия), отмечен у 9 (10,2%) женщин признаки локального фиброза в эндоцервиксе – у 19 (21,6%) пациенток, в эндометрии у 5 (5,7%) женищн.

***Патоморфология***

В результате морфологического исследования у 24 женщин признаки гиперплазии эндометрия не выявлены ни у одной пациентки. В I фазе цикла признаки ранней и средней пролиферации без лимфоцитарной инфильтрации были у 21 (87,5%) женщин, у 3 (12,5%) имелись нерезко выраженные признаки хронического воспаления – преимущественно слабо выраженная очаговая лимфоцитарная инфильтрация стромы.

***Иммуногистохимия***

Иммуногистохимическое исследование показало увеличение PgR в клетках эндометрия до 92% у 15 (71,4%) и ER – у 17 (80,9%) пациенток, что соответствовало 8-9 и 7-8 баллам (Allred Score), восстановление LIF до 7-9 баллов.

***Лазерная конверсионная диагностика***

* После фотодинамической терапии спектральная интенсивность всех отделов матки – в дне, центре полости и в области внутреннего зева нормализовались и совпадали по интенсивности, т.е. были структурированы – (в середине рисунка). После лечения показатели метаболизма, пролиферации и микроциркуляции вернулись к норме у 66 (75,0%) женщин, стали лучше у 14 (15,9%), незначительные изменения у 8 (9,0%)
* Индекс аэробности у женщин с хроническим эндометритом после ФДТ составил 1.1-1.7 (1,56±0,05) ОЕ (0,7 - 1,08 (0,92±0,04) до лечения). Микроциркуляция поверхностных слоев эндометрия нормализовывалась на фоне лечения так же, как и структурированность тканей во всех точка полости матки, составив 1,58±0,03. Исследуемые амплитудно-спектральные показатели выравнивались практически во всех отделах матки.

***Заключение***

Таким образом, использование лазерной конверсионной экспресс-диагностики и объемной фото-иммуной терапии позволило восстановить морфо-функциональное состояние эндометрия, что выражалось нормализации процессов пролиферации, в повышении уровней микроциркуляции, оксигенации и метаболизма. Восстановление рецепторного аппарата эндометрия и гемодинамики в виде нормализации показателей кровотока на уровне радиальных артерий может также рассматриваться как показатель эффективности лечения прогностическим признаком успешной имплантации.