

Міністерство охорони здоров'я України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

Імунодіагностика ендометріозу у жінок з безпліддям
(методичні рекомендації)

Чернівці 2016

Установи-розробники:

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України;

ДЗ «Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького»

ДЗ «Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України»

Автори:

д.мед.н., професор Чоп'як В.В. (Львів),

к.мед.н., доцент Коваль Г.Д. (Чернівці),

д.мед.н., професор Юзько О.М. (Чернівці),

д.мед.н., професор Пашковська Н.В. (Чернівці),

д.мед.н., професор Курченко А.І. (Київ)

Рецензенти:

д.мед.н., професор Драннік Г.М. – заступник голови Експертної проблемної комісії «Клінічна імунологія та алергологія» МОЗ та НАМН України (витяг з протоколу № 18 від 30 грудня 2014 р.)

д.мед.н., професор Чоп'як В.В. – головний позаштатний спеціаліст МОЗ України зі спеціальностей: «Алергологія», «Імунологія», «Клінічна імунологія», «Лабораторна імунологія»

д.мед.н., професор Літус В.І. – професор кафедри клінічної, лабораторної імунології та алергології НМАПО ім. П.Л. Шупика.

Голова Вченої ради БДМУ: професор Бойчук Т.М.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДРТ	– Допоміжні репродуктивні технології
ЕКЗ	– Екстракорпоральне запліднення
ЗГЕ	– Зовнішній генітальний ендометріоз
мРНК	– Матрична рибонуклеїнова кислота
ПЦНР	– Прогностична цінність негативного результату
ПЦПР	– Прогностична цінність позитивного результату
СП	– Специфічність
ЧТ	– Чутливість
CD	– Cluster of differentiation – кластер диференціювання
IFN- γ	– Interferon- γ – інтерферон- γ
IL	– Interleukin – інтерлейкін
TGF- β	– Transformed grows factor- β – трансформуючий фактор росту- β
Th	– T-helper – Т-хелпер
TLR	– Toll-like receptor, Толл-подібний рецептор
TNF- α	– Tumor necrosis factor – фактор некрозу пухлин- α

Зміст

Вступ	5
Актуальність проблеми ендометріозу асоційованого з безпліддям	5
Основна частина	6
1. Епідеміологія та етіопатогенез ендометріозу асоційованого з безпліддям	6
2. Роль імунних факторів у розвитку ендометріозу та безпліддя	8
3. Класифікація та діагностика ендометріозу	13
4. Визначення цитокінів як маркерів ендометріозу	15
Висновки	21
Перелік рекомендованої літератури	22
Додаток	25

Вступ

Актуальність проблеми ендометріозу, асоційованого з безпліддям

Ендометріоз вражає, за різними даними, 7-20% жінок фертильного віку, займає третє місце серед захворювань репродуктивної сфери, а у частці пацієнок з безпліддям становить від 25 до 50 % і є одним з ведучих чинників, що спричиняють порушення репродукції. Ендометріоз, асоційований з безпліддям, є серйозною медико-соціальною проблемою, так як викликає фізичні страждання (зокрема, виражені тазові болі), впливає на соціальне та психологічне благополуччя, змушує жінок шукати різноманітні, часто неефективні методи подолання цієї проблеми, що тягне за собою витрачання великих коштів. Все це, безумовно, знижує якість життя пацієнок. Незважаючи на значний прогрес у розумінні етіопатогенезу ендометріозу, асоційованого з безпліддям, та впровадження у практику чітких вітчизняних і міжнародних стандартів та протоколів діагностики та лікування захворювання, залишається невирішеною проблема малоінвазивної діагностики ендометріозу, адже «золотим стандартом» є лапароскопічна візуалізація, а інформативні неінвазивні методи діагностики розроблені недостатньо.

Загальновізнано, що у розвитку ендометріозу та безпліддя важливу роль відіграють імунні фактори (дефекти кілерних клітин, обмеження антигенпрезентуючої функції макрофагів, дисрегуляції ростових факторів та цитокінів, тощо). Зокрема, дослідження цитокінової регуляції розвитку безпліддя асоційованого з ендометріозом викликають увагу учених усього світу не тільки як патогенетичні чинники, а й як можливі маркери діагностики та мішені для терапевтичного втручання. Однак, не дивлячись на велику кількість робіт присвячених проблемі безпліддя пов'язаного з ендометріозом та значні успіхи у вивченні цих захворювань, їх імуніопатогенез залишається маловивченим, а неінвазивні імунологічні методи діагностики малорозробленими. Саме тому можливість неінвазивної діагностики ендометріозу є предметом пильної уваги науковців та потребують свого подальшого дослідження та вирішення.

Вкрай незрозумілим є явище безпліддя на тлі ендометріозу, так як на всіх етапах репродуктивного процесу не виявляється явної патології, а імунологічна толерантність повинна сприяти фертильності.

Виходячи з цього, розроблено методичні рекомендації, мета яких – надати лікарям практичної охорони здоров'я сучасне обґрунтування та доцільність застосування розробленого алгоритму імунодіагностики ендометріозу поєднаного з безпліддям.

Методичні рекомендації призначені для клінічних імунологів, гінекологів, репродуктологів. Наведені матеріали можуть бути застосовані при підготовці лікарів-інтернів та для післядипломної освіти лікарів зазначених спеціальностей.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

1. ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ЕТІОПАТОГЕНЕЗ ЕНДОМЕТРІОЗУ АСОЦІЙОВАНОГО З БЕЗПЛІДДЯМ

Ендометріоз (ендометріїдна хвороба) - це доброякісне гормонозалежне захворювання, в основі якого лежить гетеротопія ендометрію на тлі порушення функції гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи, імунного дисбалансу при наявності генетичної схильності (Наказ МОЗ України від 15.12.2003 р. №582 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги»). Інші прийняті визначення: **ендометріоз (ендометріїдна хвороба)** – це дисгормональне, імунозалежне захворювання з генетичною схильністю, яке характеризується доброякісним розростанням тканини за морфологічними ознаками схожої на ендометрій за межами матки.

Ендометріоз супроводжується такими явищами, як больовий синдром (альгодисменорея, біль внизу живота, не пов'язаний із менструальним циклом, диспареунія); безпліддя (первинне, вторинне); геморагічний синдром (передменструальні кровомазання, метрорагія, гіперполіменорея, порушення менструального циклу); тривале неефективне лікування хронічних аднекситів, метритів); психоневрологічні розлади; порушення функції суміжних органів (дизурія, болючість при дефекації), що, безумовно, становить серйозну медико-соціальну проблему.

Безпліддя - зниження вірогідності настання вагітності у порівнянні з загальною популяцією. За визначенням ВООЗ - це відсутність вагітності при регулярному статевому житті без застосування контрацепції впродовж року.

Епідеміологія ендометріозу асоційованого з безпліддям

Ендометріоз належить до найпоширеніших гінекологічних захворювань та вражає до за різними даними до 15% жінок репродуктивного віку. На сьогодні це захворювання має надзвичайно велике поширення та становить близько 176 млн. випадків у світі, вражаючи жінок репродуктивного віку. Ендометріоз спричиняє безпліддя у переважної більшості пацієнок і вважається другим за частотою серед чинників, що спричиняють порушення репродукції. За даними різних авторів, ендометріоз зустрічається у 25-50% жінок з безпліддям. Окрім того, ендометріоз виявляється у 25 - 47% дівчаток підліткового віку, яких оперували з приводу тазового болю. Найважливішу роль ендометріоз відіграє у розвитку безпліддя - генітальний ендометріоз асоційований з безпліддям у 25–50 % пацієнтів, а перитонеальна форма супроводжується безпліддям у 60–80 % випадків (Э.К. Айламазян, 2007, О.М. Юзько 2011).

Етіопатогенез ендометріозу асоційованого з безпліддям

Не дивлячись на численні дослідження, етіологія і патогенез ендометріозу до кінця залишаються невивченими. Зокрема, розглядаються такі теорії виникнення ендометріозу як імплантаційна, гормональна, імунна, дизонтогенетична, метапластична, неопластична, генетична. Серед них найбільшого визнання набула транслокаційна (імплантаційна) теорія - перенесення клітин ендометрію з порожнини матки через фаллопієві труби на очеревину. Персистенція ж цього «трансплантату», його імплантація та подальший ріст можуть здійснюватися тільки за певних умов: підвищеної здатності у ендометрію клітин до адгезії та імплантації, а також недостатності захисних факторів очеревини, які повинні сприяти лізису клітин, так як, далеко не в кожній жінки після ретроградних менструацій розвивається ендометріоз (Vokor et al., 2009). Ці умови реалізуються при наявності запальних процесів, порушення імунологічного статусу та гормональної регуляції, а також генетичної схильності. Доведеною є гормональна теорія, так як ендометріоз є гормонозалежним захворюванням, розвиток якого відбувається на тлі порушень функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи. Ендокринні порушення, зазвичай, характеризуються дефіцитом прогестерону, що поєднується з відносною чи абсолютною гіперестрогенемією. Однак, ряд дослідників, вивчаючи гормональні механізми розвитку ендометріозу, встановили, що виражені порушення функції гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи у хворих з малими формами ендометріозу були відсутні, і застосування гормональних препаратів для лікування безпліддя у цих хворих не збільшувало частоти настання вагітності. Останніми роками в літературі все частіше приводяться дані про поєднання безпліддя з ендометріозом (Ф.В. Дахно 2011, О.М. Юзько, 2011), що може носити незалежний характер або зумовлювати взаємнегативний вплив на перебіг захворювань обох груп.

2. РОЛЬ ІМУННИХ ФАКТОРІВ У РОЗВИТКУ ЕНДОМЕТРІОЗУ ТА БЕЗПЛІДДЯ

Відомо, що в патогенезі як безпліддя так і ендометріозу значну роль відіграють фактори імунологічної реактивності, зокрема, імунологічний фактор за різними даними становить до 15-20 відсотків чинників непліддя у парі. Тим не менше, до сьогодні немає глибокого розуміння всіх імунопатофізіологічних аспектів ендометріозу, достеменно не відомо чим відрізняється імунологічна реактивність при безплідді з ендометріозом та без нього та не відомі можливості імунотерапії як ендометріозу так і безпліддя асоційованого з ендометріозом. Тому, останніми роками все більшої уваги та визнання набуває імунологічна теорія розвитку ендометріозу. Однак, вважаючи на те, що ендометріодні гетеротопії являють собою автотрансплантат, який повинен бути елімінованим імунною системою, то в останні роки все більшої уваги приділяють імунній теорії виникнення ендометріозу та ролі цитокінів (Д.И. Соколов, 2007, К.В. Слесарева, 2013). Як відомо, перитонеальна рідина містить велику кількість елементів імунної системи, які повинні здійснювати контроль гомеостазу. Тим не менше, при ендометріозі спостерігається не тільки вихід маткового ендометрію в позаматковий простір, але і його розростання. Для глибокого розуміння патогенезу ендометріозу, слід проаналізувати різноманітні механізми імунної системи та її середників, які задіяні у розвитку та прогресуванні цього захворювання. Не менш важливу роль у протіканні безпліддя відіграє стан імунної системи організму, яка однозначно страждає при поєднанні безпліддя з ендометріозом. Оскільки ендометріозні враження часто присутні в черевній порожнині, то вони знаходяться в безпосередньому контакті з перитонеальною рідиною, котра омиває порожнини малого тазу, матку, маткові труби і яєчники. Як відомо, перитонеальна рідина містить велику кількість елементів імунної системи, які повинні здійснювати контроль гомеостазу. Тим не менше, при ендометріозі спостерігається не тільки вихід маткового ендометрію в позаматковий простір, але і його розростання. Для глибокого розуміння патогенезу ендометріозу, слід проаналізувати різноманітні механізми імунної системи та її середників, які задіяні у розвитку та прогресуванні цього захворювання. Важливу роль в патогенезі ендометріозу відіграють як вроджені так і набуті імунні реакції. Серед вроджених факторів імунологічної резистентності, що приймають участь в підтримці гомеостазу черевної порожнини ключовими клітинами виступають перитонеальні макрофаги, які, за даними літератури, становлять до 90% клітин перитонеальної рідини. У жінок, що страждають на ендометріоз, концентрація макрофагів збільшується в порівнянні зі здоровими чи безплідними без ендометріозу. Збільшення кількості макрофагів може бути пов'язано з гіперактивацією їх проліферації внаслідок запального процесу на фоні підвищеного рівня макрофаг - колонієстимулюючого фактора (M-CSF) та фактора хемотаксису моноцитів (MCP)-1. Тому макрофаги виявилися на тривалий час мішенню для вивчення імунопатогенезу ендометріозу при

безплідді. Показано, що перитонеальні макрофаги, отримані від пацієнток з безпліддям та ендометріозом в пробірці здатні виділяти підвищену кількість прозапальних цитокінів (IL-6, IL-1 β та фактора некрозу пухлин (ФНО)- α в порівнянні з перитонеальними макрофагами жінок з іншими доброякісними гінекологічними захворюваннями. Так, як IL-6, IL-1 β та TNF- α сприяють адгезії клітин ендометрію в очеревину, то підвищення секреції цих цитокінів у пацієнток з ендометріозом можуть вносити вклад в розвиток та прогресування даного захворювання (Murphy P. J., Wynn T. A., 2011). З іншого боку, в результаті активації макрофагів відмічається підвищення рівня простагландинів (ПГ), зокрема, PGE2 в перитонеальній рідині, що може спричиняти біль, зміни матки та трубного скорочення і бути причиною безпліддя за рахунок затримки транспорту яйцеклітини. Іншим важливим чинником є зменшення експресії людських лейкоцитарних антигенів (HLA) ABC та HLA-DR на перитонеальних макрофагах у хворих на ендометріоз, що розцінюється як причина дефектної презентації антигену (ектопічного ендометрію). Мало того, останні публікації вказують на те, що на перитонеальних макрофагах експресія антигенів HLA подібна до такої при вагітності – за рахунок експресії неklasичних (захисних) антигенів HLA-G (Kumpel B.M., Manoussaka M.S., 2011), тільки при вагітності така тактика імунної системи зрозуміла – збереження плода, тоді як при ендометріозі – збереження ендометріозного вогнища? Таким чином, гіпотетично, активовані макрофаги в перитонеальній рідині можуть контролювати кількість та розміри черевної патології ендометрію. На це вказують і ті дані, що використання нестероїдних протизапальних, які відновлюють цитотоксичність макрофагів сприяє зниженню активності ендометріозу. Так само велика кількість імунних середників (цитокінів) можуть сприяти поширенню клітин ендометрію в кровоносні судини, сприяючи таким чином генералізації ендометріозу. Макрофаги можуть бути класично активованими (M1) або активованими на позаклітинне середовище (M2). В присутності ІФН- γ та PAMPs таких як LPS (ліпополісахариди переважно характерні для бактеріальної інфекції), макрофаги стають M1, тоді як в присутності Th2-типу цитокінів, таких як IL-4 та IL-13, макрофаги проходять альтернативну активацію в бік M2 фенотипу. Поляризація макрофагів у бік M1 чи M2 різко змінює імунні властивості цих клітин, як свідчать потужні протимікробні властивості M1 макрофагів у порівнянні з вираженими регенеративними властивостями M2 макрофагів (Daley et al., 2010; Schwartz, 2010; Brancato and Albina, 2011; Cairo et al., 2011). Однак при ендометріозі достеменно не відомо характер переважання M1 чи M2 та принцип дихотомії T хелперів 1 та 2 типу. Від останніх залежить характер переважання відповідно про- чи протизапальних цитокінів і можливість та перспективи імунокорекції за допомогою модуляції M1 в M2 чи навпаки. Як вказувалося вище, перитонеальні макрофаги здатні синтезувати підвищену кількість прозапальних цитокінів таких як IL-6, IL-1 β та TNF- α і ці ж дані

підтвердилися по відношенню до їх вмісту в перитонеальній рідині, однак не вирішили питання про характер імунних процесів при ендометріозі.

Другим по важливості представником вродженої імунологічної резистентності перитонеальної рідини є природні кілери (ПК). ПК відіграють ключову роль на перехресті вродженого та адаптивного імунітету за рахунок здатності лізувати заражені чи пухлинні клітини та синтезувати цитокіни. Опубліковані дані вказують на те, що ПК отримані з периферичної крові здорових жінок здатні до цитотоксичності по відношенню до клітин ендометрію в пробірці. Однак, активність перитонеальних ПК клітин, отриманих від жінок з ендометріозом є зниженою. В літературі коливається кількість ПК клітин в перитонеальній рідині у різних пацієнтів і акцентується увага на функціональних дефектах ПК, а не їх кількості. Одним з пояснень зниження активності ПК клітин є підвищення рівня трансформувального фактора росту (TGF)- β та PGE2 в перитонеальній рідині у жінок з ендометріозом, які подавляють активність ПК клітин та синтезуються макрофагами. Іншим поясненням зниження активності ПК клітин при ендометріозі є збільшення експресії гальмівних рецепторів вбивства клітини (KIR). Ці рецептори попереджують цитотоксичність проти клітини-мішені, на якій представлені антигени головного комплексу гістосумісності I класу (MHC-I). Цікаво, що експресія KIR рецепторів у жінок з ендометріозом збільшується. Цей самий феномен спостерігається при вагітності. Важливим фактом є те, що ендометріюїдні клітини погано піддаються лізису гетерологічними ПК клітинами, отриманими з периферичної крові, що вказує на наявність в ендометріюїдних вогнищах (клітинах?) чинників, що протистоять імунній системі. Отже, останні літературні дані не повністю розкривають значення вродженого імунітету у розвитку та прогресуванні ендометріозу. Особливо мало вивчений характер цитокінового балансу (дисбалансу?) на рівні місцевого імунітету – в перитонеальній рідині.

Патологія ендометріозу може розглядатися як «трансплантація» аутологічної тканини, однак для успішного приживлення трансплантату потрібно або пригнічення імунних факторів або їх толерантність до трансплантату. Підтвердженням цієї гіпотези є й вищевказаний характер експресії неklasичних молекул HLA антигенів та KIRs рецепторів, що спрацьовує за принципом захисту плоду при вагітності. У хворих з ендометріозом в перитонеальній рідині присутні Т-клітини з маркерами CD3, CD4, CD8, рівень яких підвищений в ендометріозній тканині. Тому, правильніше думати про «імунологічну толерантність» до ектопічного ендометрію. Однак, поглиблений аналіз співвідношення Т-клітин та, зокрема, їх функціональне диференціювання (Th1, Th2, Th17 клітин) в перитонеальній рідині при ендометріозі до цих пір залишається невиясненим.

Дуже мало переконливих публікацій стосовно регуляторних Т-клітин CD25+Foxp3+ (Treg) та їх ролі у небажаній «імунологічній толерантності» по відношенню до ендометріюїдних вражень. Опубліковані дані не вказують на наявність автореактивних Т-клітин в черевній порожнині жінок без

ендометріозу, котрі могли б дати пояснення успішному видаленню тканини ендометрію при її потраплянні в черевну порожнину внаслідок ретроградних менструацій. Отже, слід думати, що елімінація ендометріозних вогнищ є прерогативою інших факторів імунної системи. Зокрема, така мала кількість даних пояснюється складністю взяття матеріалу для дослідження (необхідність лапароскопії).

З гуморальних чинників імунної відповіді при ендометріозі відмічено зростання активованих VCD20+-клітин в ектопічному ендометрії, підвищення автоантитіл, таких як антифосфоліпідні та антигістонові. Сироватка та цервікальний секрет жінок з ендометріозом містять автоантитіла проти тканини яєчників. Це підтримує автоімунну теорію розвитку ендометріозу. Про це, зокрема, свідчать дані про «самозміну» ектопічного ендометрію в аспекті антигенного складу та ініціацію ним автоімунної відповіді. Важливим аспектом автоімунного генезу безпліддя є наявність антиспермальних антитіл як фактора, що доводить власне автоімунний генез. Однак, не дивлячись на широке вивчення цього питання у світі даних за наявність антиспермальних антитіл у перитонеальній рідині жінок з ендометріозом не знайдено.

Роль цитокінів у розвитку ендометріозу поєднаного з безпліддям

В центрі наукової уваги стала проблема балансу цитокінів Th1/Th2 в перитонеальній рідині хворих з ендометріозом (співвідношення прозапальних Th1-подібних та протизапальних Th2-подібних цитокінів). Як вказувалося вище, було встановлено, що при ендометріозі в перитонеальній рідині зростає кількість прозапальних інтерферону (ІФН)- γ та ІЛ-2, а також протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10. Однак, є дані, що вказують на протилежне, що ще раз підкреслює необхідність дослідження даного питання. Коротко концепція дихотомії Th1 та Th2 лімфоцитів полягає в тому, що Th1 секретовані цитокіни такі як ІФН- γ та ІЛ-2 призводять до активації Т-клітинного імунітету та гіперчутливості сповільненого типу, а Th2 залежні цитокіни, такі як ІЛ-4 и ІЛ-5 - стимулюють гуморальний імунітет і подавляють Th1-опосередковані реакції (Galleri L., Luisi S., Rotondi M., Romagnani P., 2009). Однак чи являється ендометріоз типовим Th1- чи Th2-опосередкованим захворюванням достеменно не відомо. Зокрема, це пояснюється новими поглядами на дихотомію Th1- чи Th2 лімфоцитів, враховуючи нові дані про роль недавно (2005) ідентифікованих прозапальних Th17, які виділяють високий рівень ІЛ-17А, ІЛ-17F, ІЛ-6 та TNF- α цитокінів. Цікаво, що введення рекомбінантного людського TNF-інгібітора знижує експериментальний ендометріоз у щурів, а ІЛ-12 знижує патологію ендометрію в природніх умовах, ймовірно, за рахунок підвищення цитотоксичної активності. Досліджено, що в сироватці крові та перитонеальній рідині жінок з ендометріозом в порівнянні з рівнем в контрольній групі без ендометріозу підвищуються рівні ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-17 та ІЛ-23, останній найбільше, що свідчить про можливу роль цього цитокіну у

безплідді жінок з ендометріозом. Таким чином, питання про- чи протизапальних цитокінів достеменно не вирішене і вимагає подальшого поглибленого вивчення. З іншого боку відомо, що про- та протизапальні цитокіни в інших видах запальних процесів дуже тісно корелюють з системами про- та антиоксидантів, відповідно і терапія, направлена на зниження активності прозапальних цитокінів, одночасно інгібує стан прооксидантної системи і навпаки.

Показано, що перитонеальні макрофаги, отримані від пацієнток з безпліддям та ендометріозом в пробірці здатні виділяти підвищену кількість прозапальних цитокінів, наприклад, ІЛ-1 β та фактора некрозу пухлин (ФНО- α) в порівнянні з перитонеальними макрофагами жінок з іншими доброякісними гінекологічними захворюваннями (Na Y.J., Lee D.H., 2011). Так, як ІЛ-6, ІЛ-1 β та ФНО- α сприяють адгезії клітин ендометрію в очеревину, то підвищення секреції цих цитокінів у пацієнток з ендометріозом можуть вносити вклад в розвиток та прогресування даного. В останні роки велика увага приділяється вивченню ролі цитокінів в патогенезі перитонеального ендометріозу. Цитокіни є посередниками міжклітинних взаємодій, регулюють кровотворення, імунну відповідь, клітинний цикл у різних тканинах, беруть участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах. Є дані про підвищення рівнів ФНО- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-15 у перитонеальній рідині хворих на ендометріоз (Д.И. Соколов, 2007, Л.А. Марченко, 2011). Одним з цитокінів, ідентифікація та вивчення якого відбулося порівняно недавно є інтерлейкін-17 (ІЛ-17). Виділення ІЛ-17 відбувається після відщеплення сигнального пептиду, що складається з 23 амінокислот. Амінокислотна послідовність ІЛ-17 схожа лише на білкову структуру герпесвірусу та не схожа на інші цитокіни чи відомі протеїни, що вказує на те, що ІЛ-17 та його рецептори можуть бути частиною нового сімейства сигнальних білкових рецепторів.

3. КЛАСИФІКАЦІЯ ТА ДІАГНОСТИКА ЕНДОМЕТРІОЗУ

Класифікація за МКХ-10

Шифр МКХ-10-N 80

N80 Ендометріоз

N 80.0 Ендометріоз матки (Аденоміоз)

N 80.1 Ендометріоз яєчника

N 80.2 Ендометріоз маткової труби

N 80.3 Ендометріоз тазової очеревини

N 80.4 Ендометріоз прямокишково-піхвової перетинки і піхви

N 80.5 Ендометріоз кишечника

N 80.6 Ендометріоз шкірного рубця

N 80.8 Інший ендометріоз

N 80.9 Ендометріоз, не уточнений

Ендометріоз(топічна класифікація) (С):

I. Генітальний ендометріоз.

1. Внутрішній ендометріоз.

1.1. Ендометріоз тіла матки(I, II, III (аденоміоз) стадії у залежності від глибини ураження міометрію):

- залозиста, кістозна, фіброзна форма;
- вогнищева, вузлова, дифузна форма.

1.2. Ендометріоз цервікального каналу.

1.3. Ендометріоз інтрамуральної частини маткових труб.

2. Зовнішній ендометріоз.

2.1. Перитонеальний ендометріоз:

- ендометріоз яєчників(інфільтративна, пухлинна форма);
- ендометріоз маткових труб;
- ендометріоз тазової очеревини(червоні, чорні, білі форми).

2.2. Екстраперитонеальний ендометріоз:

- ендометріоз піхвової частини шийки матки;
- ендометріоз піхви, вульви;
- ретроцервікальний ендометріоз;
- ендометріоз маткових зв'язок;
- ендометріоз параметральної, паравезикальної, паракольпальної клітковини(без і з проростанням в сечовий міхур, пряму кишку).

3. Зовнішньо-внутрішній ендометріоз.

4. Сполучені форми генітального ендометріозу(генітальний ендометріоз у сполученні з іншою генітальною або екстрагенітальною патологією).

Діагностичні критерії ендометріозу у жінок

1. Скарги.

- больовий синдром (альгодисменорея, біль внизу живота, не пов'язаний із менструальним циклом, диспареунія);
- безпліддя (первинне, вторинне);

- геморагічний синдром(передменструальні кровомазання, метрорагія, гіперполіменорея, порушення менструального циклу);
- тривале неефективне лікування хронічних аднекситів, метритів);
- психоневрологічні розлади;
- порушення функції суміжних органів(дизурія, болючість при дефекації);
- відсутність симптомів.

1. Зовнішній ендометріоз (ендометріоз яєчників, маткових труб, очеревини)

2. Фізикальне обстеження. Бімануальне дослідження: - збільшення, тяжистість, нерухливість, фіксація у позаматковому просторі додатків; - обмеження в рухливості органів малого тазу; - болючість при пальпації (С).

3.Ультразвукове дослідження абдомінальним, вагінальним, ректальним датчиком (А): - збільшення додатків, їх неоднорідна акустична щільність, фіксація у задньому склепінні; - наявність утворення круглявої форми із чіткою капсулою, слабоекхогенною внутрішньою структурою(зависсю); - ознаки перифокального спайкового процесу.

4. Комп'ютерна томографія, магнітно-резонансна томографія(А, С):
- утворення круглявої форми із достатньо щільною капсулою; - зрощення із іншими структурами.

5. Лапароскопія (А) «Золотий стандарт» діагностики: - сині, багряні, кистозні, крапчасті або вузликові структури, біляві або сіруваті вузлики; - наявність рубцевих змін, злукового процесу; - синюваті кистозні структури–ендометріодні кисти.

6. Неінвазивні лабораторні методи діагностики. Визначення онко-маркерів (СА-125)(А, С)

Ретроцервікальний ендометріоз, ендометріоз зв'язок, клітковини діагностується п.2 та п.5.

Цитологічне та гістологічне дослідження матеріалу із порожнини матки та шийки матки малоінформативне, достовірним є лише гістологічний аналіз біопсійного матеріалу, матеріалу гістерорезекції та післяопераційних препаратів (С).

Таким чином, серед стандартних методів діагностики ендометріозу повністю достовірним методом може бути лише лапароскопія, яка являє собою інвазивну методику, в той час, як неінвазивні методи низькочутливі, а малоінвазивні лабораторні маркери малочутливі та їх недостатньо. Особливо, це стосується перитонеальних форм ендометріозу, які належать до найпоширеніших, однак не виявляються інструментальними методами. Тому доповнення існуючих методів діагностики ендометріозу малоінвазивними лабораторними методами, зокрема, імунологічними є вкрай необхідним, особливо, для визначення динаміки ефективності лікування перитонеального ендометріозу, діагностованого лапароскопічним методом у жінок з безпліддям, задля запобігання повторній лапарокопії.

4. ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОКІНІВ ЯК МАРКЕРІВ ЕНДОМЕТРІОЗУ

Імунодіагностика ендометріозу на даному етапі ще достеменно не розроблена та мало впроваджена в практичну роботу. Однак, дослідження цитокінової регуляції розвитку безпліддя, спричиненого ендометріозом, викликають увагу учених усього світу не тільки як патогенетичні чинники, а й як можливі маркери діагностики та мішені для терапевтичного втручання. Тому важливим додатковим методом діагностики ендометріозу може бути визначення цитокінів в сироватці крові.

Особливості цитокінового профілю у жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям

На підставі проведених у ВДНЗ України «Буковинському державному медичному університеті», ДЗ «Львівському національному медичному університеті ім. Данила Галицького» та «Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України» незалежних досліджень 172 жінок, хворих на безпліддя, у яких етіологічним чинником безпліддя був верифікований ендометріоз, встановлено та запропоновано для впровадження нові підходи до імунодіагностики ендометріозу у жінок з безпліддям на основі визначення рівнів цитокінів у сироватці крові. Зокрема, на попередньому етапі нами проведено дослідження рівнів цитокінів сироватки крові та перитонеальної рідини у жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям. Досліджувану групу склали 96 жінок репродуктивного віку з безпліддям, поєднаним із ендометріозом, (віком від 18 до 43 років, середній вік становив 31,01 рік), а контрольну групу склали 33 жінки з безпліддям трубного генезу (віком від 19 до 44 років, середній вік становив 29,49 років). Всі жінки поступили в клініку з діагнозом безпліддя, впродовж не менше 2 років (середня тривалість безпліддя становила 4,4 роки). З метою в'ясування природи безпліддя всім пацієнткам була проведена діагностично-лікувальна лапароскопія, під час якої був встановлений кінцевий діагноз. Зокрема, діагноз ендометріозу встановлювався на основі характерної візуальної картини, під час лапароскопічної операції, та підтверджувався результатами гістологічного дослідження. Кінцевий діагноз безпліддя трубного генезу також встановлювався під час лапароскопії на основі двобічної трубної непрохідності. Варто зазначити, що контрольну групу склали пацієнтки, які на момент дослідження не мали ознак гострого запалення, а трубний фактор безпліддя був наслідком перенесеного запального процесу в анамнезі. Про це свідчили негативні результати мікробіологічних та вірусологічних досліджень. На момент дослідження у жінок обох груп не було виявлено будь-якої патології з боку інших органів та систем. Всі операції проводилися в інтервалі першої фази менструального циклу. Перитонеальна рідина відбиралася під час проведення

лапароскопічного втручання, а кров - перед цією процедурою. Визначення рівнів цитокінів в сироватці крові та перитонеальній рідині проводили імуноферментним методом на наборах фірми "Вектор Бест" виробництва Росія на приладі «STAT FAX 303 PLUS». Одержані результати дослідження аналізувалися за допомогою комп'ютерних пакетів "STATISTICA" StatSoft Inc та Excel XP для Windows.

Показано, що для ендометріозу, поєданого з безпліддям є характерним значний дисбаланс прозапальних та протизапальних цитокінів як на системному так і на локальному рівнях, однак, він є більш вираженим для локальних цитокінів у порівнянні з системними, що пояснюється безпосередньою участю у місцевому запальному процесі, спричиненому ендометріозом. Зокрема, зміни цитокінів сироватки крові стосувалися як про- так і протизапальних фракцій, а саме - відмічено достовірне зростання в сироватці крові прозапальних цитокінів: ІЛ-12, ІЛ-18, ФНП - α та достовірне зниження рівня ІЛ-2. Серед протизапальних цитокінів відмічалось достовірне зростання ІЛ-6 та ІЛ-10. Найбільших змін зазнали ІЛ-2, який знижувався в 3,9 рази та ФНП- α , який зростав більш ніж у 2 рази. Найбільшу частку серед усіх досліджуваних цитокінів становив ІЛ-10. Дані демонструє табл.1.

Таблиця 1

Рівні цитокінів у сироватці крові у хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям ($M \pm m$)

№п/п	Цитокін	Досліджувана група n 65	Контрольна група n 33	P
		Рівень пг/мл	Рівень пг/мл	
Прозапальні цитокіни				
1	ІЛ-1β	29,7 \pm 2,6	29,4 \pm 3,2	>0,05***
2	ІЛ-12	23,8 \pm 4,69	27,12 \pm 6,61	<0,05*
3	ІЛ-18	76,9 \pm 13,46	62,98 \pm 13,26	<0,05*
Th1 цитокіни				
4	ІЛ-2	7,1 \pm 2,0	28,1 \pm 6,2	<0,001**
5	ФНП-α	11,7 \pm 2,2	5,2 \pm 0,7	<0,05*
6	ІНФ-γ	24,8 \pm 0,8	27,1 \pm 1,4	>0,05***
Treg цитокіни				
7	ТФР-β	80,93 \pm 10,08	82,21 \pm 13,83	>0,05***
Th2/Treg цитокіни				
8	ІЛ-6	9,65 \pm 3,36	6,51 \pm 3,19	<0,001**
9	ІЛ-10	172,04 \pm 17,95	134,53 \pm 19,89	<0,05*
Th17 цитокіни				
10	ІЛ-17	74,51 \pm 13,43	78,18 \pm 8,88	>0,05***

Примітка: P відображає статистичну вірогідність різниці між показниками досліджуваної та контрольної груп. p<0,05– * та p<0,001 – ** - є достовірною різницею, p>0,05*** - немає достовірної різниці.

На попередніх етапах дослідження встановлено, що у перитонеальній рідині відмічалось значно вище зростання практично всіх як про- так і протизапальних цитокінів, окрім, ІЛ1- β . У порівнянні з різницею у концентрації цитокінів між дослідною і контрольною групою у сироватці крові, коли відхилення були максимум в три рази, то в перитонеальній рідині такі відмінності доходили до десятків разів. Зокрема, рівень ІЛ-2 зріс майже в 38 разів, рівень ІЛ-6 зріс в 20 разів, ІЛ-17 - майже у 8 разів, ТНФ- β - в 5,5 разів. Найвищий рівень мав так само, як і при дослідженні сироватки - ІЛ-10. На нашу думку, такі зміни пов'язані з безпосередньою активацією відповідних клітин-продуцентів на локальному рівні та можуть відігравати важливу роль у виникненні безпліддя при ендометріозі, порушуючи фізіологічне цитокінове оточення на різних етапах репродуктивного процесу (табл. 2).

Таблиця 2

Рівень цитокінів у перитонеальній рідині у хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям ($M \pm m$)

№п/п	Цитокін	Досліджувана група n 65	Контрольна група n 33	P
		Рівень пг/мл	Рівень пг/мл	
Прозапальні цитокіни				
1	ІЛ-1 β	20,42 \pm 6,29	18,41 \pm 2,89	>0,05***
2	ІЛ-12	30,79 \pm 6,04	15,74 \pm 1,41	<0,001**
3	ІЛ-18	96,18 \pm 23,79	30,94 \pm 7,25	<0,001**
Th1 цитокіни				
4	ІЛ-2	114,3 \pm 2,7	3,0 \pm 0,3	<0,001**
5	ФНП- α	16,8 \pm 0,6	3,1 \pm 0,4	<0,001**
6	ІНФ- γ	42,6 \pm 1,6	20,5 \pm 0,5	<0,05*
Treg цитокіни				
7	ТФР- β	62,98 \pm 10,09	51,09 \pm 8,92	<0,05*
Th2/Treg цитокіни				
8	ІЛ-6	98,94 \pm 42,88	4,71 \pm 1,87	<0,001**
9	ІЛ-10	194,48 \pm 53,61	87,46 \pm 28,05	<0,001**
Th17 цитокіни				
10	ІЛ-17	38,35 \pm 14,07	4,83 \pm 2,77	<0,001**

Примітка: p відображає статистичну вірогідність різниці між показниками досліджуваної та контрольної груп. p<0,05– * та p<0,001 – ** - є достовірною різницею, p>0,05*** - немає достовірної різниці.

Діагностичне значення визначення цитокінів для діагностики ендометріозу у жінок з безпліддям

Отримавши дані цитокінового профілю, логічним було проведення визначення діагностичної цінності вищевказаних цитокінів для діагностики ендометріозу у жінок з безпліддям.

На даному етапі дослідження було проведено оцінку діагностичної цінності визначення концентрації цитокінів в сироватці крові для діагностики безпліддя поєднаного з ендометріозом шляхом визначення специфічності (СП), чутливості (ЧТ) та ПЦПР прогностичної цінності позитивного (ПЦПР) та негативного результатів (ПЦНР) та позитивного та негативного відношення правдоподібності результатів (ВП+, ВП-) (табл. 4).

Таблиця 4

Діагностична цінність концентрації окремих цитокінів у сироватці крові у виявленні ендометріозу, асоційованого з безпліддям

Результати дослідження	Діагностична цінність, % (95% ДІ)				Відношення правдоподібності	
	чутливість	специфічність	прогностична цінність		позитивного результату	негативного результату
			позитивного результату	негативного результату		
ІЛ-2 (менше 10 пг/мл)	87 75-95	40 24-56	64 51-75	72 49-89	1,4	0,3
ІЛ -6 (більше 9,5 пг/мл)	38 25-33	87 73-95	79 57-92	53 44-66	3,1	0,6
ІЛ -10 (більше 140 пг/мл)	69 56-80	75 58-87	81 61-90	60 45-73	2,7	0,4
ІЛ -12 (менше 21 пг/мл)	40 27-55	90 76-97	83 62-95	55 42-67	4,0	0,6
ІЛ -18 (більше 71 пг/мл)	67 52-80	80 64-90	80 65-91	66 51-79	3,3	0,4
ФНП-α (більше 8 пг/мл)	63 48-76	82 67-92	81 65-92	64 50-77	3,6	0,4

Оптимальною, на наш погляд, є діагностична цінність ІЛ-10, ФНП-α та ІЛ-18, так як саме при аналізі цих цитокінів виявлено поєднання найвищих показників ЧТ, СП та ПЦПР та ПЦНР. Показники діагностичної цінності ФНП-α наступні: чутливість (Чт) – 63%, специфічність (Сп) – 82%, прогностична цінність позитивного результату (ПЦПР) – 81% прогностична

цінність негативного результату (ПЦНР) – 64%, відношення правдоподібності позитивного результату (ВППР) – 3,6 відношення правдоподібності негативного результату (ВПНР) – 0,4. Діагностична цінність ІЛ-10 становить: Чт – 69%, Сп – 75%, ПЦПР – 81%, ПЦНР – 60%, ВППР – 2,7, ВПНР – 0,4. Показники діагностичної цінності ІЛ-18 складають: Чт – 67%, Сп – 80%, ПЦПР – 80%, ПЦНР – 66%, ВППР – 3,3, ВПНР – 0,4.

Тому, це дає підстави стверджувати, що в разі підвищених рівнів ФНП - α (більше 8 пг/мл), ІЛ-10 (більше 140 пг/мл) та ІЛ - 18 (більше 71 пг/мл) діагностується ймовірність ендометріозу.

При аналізі діагностичного значення цитокінів перитонеальної рідини визначення СП, ЧТ, ПЦПР, ПЦНР, ВП+, ВП- стало можливим лише для ІЛ-10 і становило 90%, 90%, 95%, 83%, 9,9 та 0,1 відповідно (табл. 5). Проаналізувати вищезазначені показники для інших досліджуваних цитокінів не вдалося, так як дуже великі відмінності між показниками дослідної та контрольної груп не дозволили використати стандартні формули обчислення цих показників. В той же час, цитокіни перитонеальної рідини не можуть бути неінвазивними маркерами діагностики безпліддя поєднаного з ендометріозом, що обмежує практичну необхідність використання.

Таблиця 5

Діагностична цінність концентрації окремих цитокінів у перитонеальній рідині у виявленні ендометріозу, асоційованого з безпліддям

Результати дослідження	Діагностична цінність, % (95% ДІ)				Відношення правдоподібності	
	чутливість	специфічність	прогностична цінність		позитивного результату	негативного результату
			позитивного результату	негативного результату		
ІЛ-10 (більше 130 пг/мл)	90 80-96	90 75-98	85 86-98	83 67-93	9,9	0,1

Таким чином, до загальноприйнятої діагностичної програми (лабораторні, фізикальні дослідження, ультразвукові дослідження абдомінальним, вагінальним, ректальним датчиком тощо) у жінок, хворих

на безпліддя, пропонується додатково визначати рівні цитокінів: фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та інтерлейкіну-18 (ІЛ-18) у сироватці крові імуноферментним методом. В разі підвищених рівнів ФНП- α (більше 8 пг/мл), ІЛ-10 (більше 140 пг/мл) та ІЛ-18 (більше 71 пг/мл) діагностується ймовірність ендометріозу.

Факти доказовості

У цих методичних рекомендаціях застосовується загальноприйнята система оцінки рівнів доказовості і ступенів рекомендації, заснована на розробках Оксфордського центру доказової медицини (ОСЕВМ Levels of Evidence Working Group "The Oxford 2011 Levels of Evidence"). Зокрема, проведене дослідження має рівні доведеності первинних даних - 2+ та його можна трактувати за градацією доказовості як рівень С (дослідження випадок-контроль або дослідження з неякісним або залежним «золотим» стандартом).

Перевага запропонованого методу діагностики

Застосування запропонованого способу імунодіагностики ендометріозу додатково до загальноприйнятої програми у хворих на безпліддя дозволяє прискорити та оптимізувати діагностичну програму таких хворих та контролювати перебіг ендометріозу в динаміці лікування.

Опис технології – Додаток А.

Показання до застосування. Безпліддя асоційоване з ендометріозом у жінок репродуктивного віку.

Протипоказання до застосування. Відсутні.

Умови, які забезпечують реалізацію практичного застосування методу: наявність імуноферментного аналізатора та набору реактивів для визначення вмісту ФНП – α , ІЛ-12 та ІЛ-18 у сироватці крові.

Критерії оцінки ефективності використання. Аналіз ефективності запропонованого методу діагностики ендометріозу на основі виявлення змін цитокінів у сироватці крові дозволив відмітити їх доцільність як додаткових досліджень до стандартних рекомендацій в лікуванні ендометріозу.

ВИСНОВКИ

1. За показниками специфічності, чутливості, прогностичної цінності позитивного та негативного результатів, відношення правдоподібності позитивного та негативного результатів, визначення рівнів цитокінів у сироватці крові рекомендуються в якості інформативних додаткових діагностичних маркерів ендометріозу у жінок з безпліддям.

2. Для діагностики ендометріозу пропонується додатково до стандартних діагностичних методів визначати рівні цитокінів: фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та інтерлейкіну-18 (ІЛ-18) у сироватці крові імуноферментним методом. В разі підвищених рівнів ФНП- α (більше 8 пг/мл), ІЛ-10 (більше 140 пг/мл) та ІЛ-18 (більше 71 пг/мл) прогнозується висока ймовірність ендометріозу.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Айламазян Э.К. Генитальный эндометриоз / Э.К. Айламазян, В.В. Потин, М.А. Тарасова // Гинекология от пубертата до постменопаузы. М : Медпресс -информ. - 2007. - №1. - С. 284 - 302.
2. Біостатистика: [за ред. проф. В.Ф. Москаленка]. – К.: Книга плюс, 2009. – 184 с.
3. Дахно Ф.В. Безпліддя в Україні: аналіз ситуації / Ф.В. Дахно // Здоров'я України. -2011.- №12.- С.10.
4. Ищенко А.И. Современные проблемы наружного генитального эндометриоза / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина, И.В. Станоевич // Акуш. и гинекол. – 2007 - №5 - С.67- 73.
5. Коваль Г.Д. Локальна продукція прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом асоційованим з безпліддям / Г.Д. Коваль// Імунологія та алергологія. Наука і практика.-2012.- №4.-с.28-31.
6. Коваль Г.Д. Порівняльна характеристика системної та локальної концентрації прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом асоційованим з безпліддям / Г.Д. Коваль // Імунологія та алергологія. Наука і практика.-2012.- №3.-С.22-25.
7. Марченко Л.А. Современный взгляд на отдельные аспекты патогенеза эндометриоза (обзор литературы) / Л.А. Марченко, Л.М. Ильина // Проблемы репродукции (сборник статей по эндометриозу). - 2011. - №1. - С. - 20-25.
8. Наказ МОЗ України від 08.10.2007 № 626 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги хворим з імунними захворюваннями».
9. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги [Наказ МОЗ України № 582 від 15. 12. 2003]. — 2003. — Офіц. вид. — Офіційний сайт МОЗ України: <http://www.moz.gov.ua>. – 98 с. (Нормативний документ Міністерства охорони здоров'я України).
10. Слесарева К.В. К вопросу о патогенезе наружного генитального эндометриоза. / К.В. Слесарева, Н.В. Ермолова, В.А. Линде, Л.В. Колесникова, Л.Р. Томай. // Журнал фундаментальной медицины и биологии. - 2013. - №1. - С. - 18 - 22.
11. Соколов Д.И. Содержание хемокинов и цитокинов в перитонеальной жидкости больных наружным генитальным эндометриозом различной

- степени тяжести./ Д.И. Соколов, П.Г. Кондратьева, М.И. Ярмолинская // Медицинская иммунология. - 2007. - Т. 9, № 1, с. 85-90.
12. Юзько О.М. Застосування допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О.М.Юзько, Т.А.Юзько // Жіночий лікар. – 2010. – № 2 (28). – С. 30–34.
 13. Юзько О.М. Клінічно-статистичний аналіз використання в Україні допоміжних репродуктивних технологій для лікування безпліддя / О.М. Юзько // Буковинський медичний вісник. -2011.- Т.15, №3 (59).- С.135-137.
 14. Berbic M. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition / M.Berbic, A.J. Hey-Cunningham, C. Ng, N.Tokushige, S.Ganewatta, R. Markham // Hum Reprod. – 2010. – № 25. – P. 900–907.
 15. Bokor A. Quantity and quality of retrograde menstruation: a case control study / A. Bokor, S Debrock, M. Drijkoningen, W Goossens // Reprod Biol Endocrinol. - 2009. - № 7. P.123.
 - 16.Cairo G. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. / G. Cairo, S. Recalcati, A. Mantovani, M. Locati // Trends Immunol. - 2011. - Vol.32.- №6.- P.241–247.
 17. Capobianco A. Endometriosis, a disease of the macrophage / A. Capobianco, P. Rovere-Querini // Front Immunol. - 2013. - Vol 4.- № 9. PMC3556586
 18. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? / G.Chaouat //Semin Immunopathol. – 2007. – № 29. – P. 95–113.
 19. Charles O.A. Role of TGF- β s in normal human endometrium and endometriosis / O.A. Charles, L. Omwandho, G. Konrad // Human Reprod. - 2010. - Vol.1.- P.101 - 109.
 - 20.Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis / E.Kalu, N.Sumar, T. Giannopoulos et al. // J Obstet Gynaecol Res.– 2007. –Vol.33, № 4. – P. 490–495.
 - 21.Fan W. Association between interleukin-10 promoter polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis. / W.Fan, S. Li, Q. Chen, Z. Huang, Q. Ma, Z. Xiao // Gene. - 2013.- №1.- p. 49 - 55.
 22. Galleri L. Low serum and peritoneal fluid concentration of interferon-gamma-induced protein-10 (CXCL10) in women with endometriosis / L. Galleri, S. Luisi, M. Rotondi, P. Romagnani // Fertil Steril. - 2009. - 91:331-334. [PubMed]

23. Hassa H. Cytokine and immune cell levels in peritoneal fluid and peripheral blood of women with early - and late-staged endometriosis. / H. Hassa, H. Mete Tanir, B. Tekin, S. D. Kirilmaz, F. Sahin Mutlu // Arch Gynecol Obstet. - 2009. - Vol. 279.-№. 6.- P. 891-895.
24. Khan K.N. Toll-like receptor system and endometriosis. / K.N.Khan, M. Kitajima, A. Fujishita et al. // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2013.- Vol. 39. – N 8. – P.1281–1292.
25. Mcleod B.S. Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors / B.S. Mcleod, M.G. Retzloff // Clin. Obstet. Gynecol. - 2010. - Vol. 53. - P. 39 - 396.
26. Na Y.J. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of monocyte-specific chemokines by leukocytes. / Y.J. Na, D.H. Lee, S.C. Kim, J.K. Joo, J.W. Wang. // Arch Gynecol Obstet. - 2011. - №1. - Vol.283.- P.1333-1341.

Протокол визначення концентрації цитокінів у сироватці крові та перитонеальній рідині

Рівень цитокінів сироватки крові та перитонеальної рідини (IL-2, IFN- γ і TNF- α , IL-10 IL-13, IL-12, IL-17, IL-18) визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Для визначення концентрації цитокінів використовували комерційні набори тест-систем "Вектор Бест" виробництва Росія.

В 96-лункові планшети додавали по 100 мкл «нульової дози» з набору у відповідні лунки для побудови стандартної кривої. В інші лунки додавали по 50 мкл досліджуваної сироватки. Потім у кожен лунку вносили по 25 мкл кролячих поліклональних антитіл. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 3 годин. Лунки 5 разів ретельно промивали буферним розчином і видаляли залишки промиваючої рідини. Після промивання в кожен лунку додавали по 50 мкл кон'югата кролячих антитіл і лужної фосфатази. Інкубацію проводили при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Повторювали промивання планшети п'ять разів і вносили в кожен лунку по 200 мкл приготовленого хромогенного агента. Після останньої 20-хвилинної інкубації проводили визначення оптичної щільності стандартів і досліджуваних зразків сироватки та перитонеальної рідини за допомогою імуноферментного аналізатора "STAT-FAX-303 PLUS"(США) при довжині хвилі в 492 нанометра. Отримані кількісні результати статистично оброблялися стандартною комп'ютерною програмою Microsoft Excel.