



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30766 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ НЕДОСТАТНОСТІ ЛЮТЕЇНОВОЇ ФАЗИ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛУ

1

2

(21) u200712674

(22) 15.11.2007

(24) 11.03.2008

(72) БУЛАВЕНКО ОЛЬГА ВАСИЛІВНА, UA,
ТАТАРЧУК ТЕТЯНА ФЕОФАНІВНА, UA,
БІКТИМІРОВ ВІКТОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ.М.І.ПИРОГОВА, UA

(56)

(57) Спосіб діагностики недостатності лютеїнової фази менструального циклу, що передбачає гістологічне дослідження ендометрію, який відрізняється тим, що при імуногістохімічному дослідженні ендометрію визначають рівень експресії тромбоспондину в паренхіматозно-стромальних елементах і при рівні активності процесу в 2-3 бали діагностують недостатність лютеїнової фази, а при рівні 0-1 бал - повноцінну лютеїнову фазу.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до акушерства і гінекології, а саме до способу діагностики недостатності лютеїнової фази менструального циклу. Може бути використана в комплексній діагностиці недостатності лютеїнової фази менструального циклу, а також для прогнозу перебігу вагітності.

Відомо, що з метою діагностики недостатності лютеїнової фази застосовують морфологічні, гістохімічні та біохімічні методи досліджень, які відрізняються між собою за точністю і складністю їх виконання.

Найбільш близьким є відомий спосіб діагностики недостатності лютеїнової фази на основі гістологічного дослідження біопатів ендометрію (Топчиева О. Л., Прянишников В. А., Демкова З. П. „Биопсия эндометрия”. - М. - Медицина. - 1978. - с.47-50; с.128-131; Хмельницкий О. К. „Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний”. - Сотис - С.Петербург. - 1994. - с.115-151).

Гістологічні дослідження біопатів ендометрію з використанням загальногістологічних та гістохімічних методик має ряд недоліків. По перше необхідно проводити дослідження на значній кількості біопсійного матеріалу. Про недостатність лютеїнової фази судять по ступеню секреторних перетворень залоз і змінами стромально - судинного компоненту. При цьому відсутні кількісні параметри діагностики недостатності лютеїнової фази.

Головною ознакою повноцінності лютеїнової фази є розвиток спіральних артерій з

„клубочками”, які забезпечують повноцінну трофіку ендометрію. При гістологічному дослідженні біопсійного матеріалу такі судини не завжди виявляються, що залежить від кількості ендометрію взятого для дослідження. Повну гістологічну картину недостатності лютеїнової фази можна отримати тільки після вишкрібання порожнини матки. Проте це втручання не є безпечним для організму.

В клінічній практиці про стан лютеїнової фази судять по рівню прогестерону. Дослідження вмісту сироваткового прогестерону на 21-24 добу циклу не є достеменним показником недостатності лютеїнової фази, оскільки нормальна його концентрація завжди свідчить про факт овуляції і не є гарантом повноцінної секреторної трансформації ендометрію (Сметник В. П., Тумилович Л. Г. Неоперативная гинекология. М.: Мир. - 1997. - с.436-441). Недоліком цього методу є те, що при нормопрогестеронемії на фоні адекватного розвитку маточного епітелію і строми спостерігається недорозвинення залозистого апарату і зменшення залоз з секретом. Разом з тим, виявляються високоактивні залози. Між ступенем секреторних перетворень залоз і змінами стромально - судинного компоненту можливі невідповідності. Структурна повноцінність ендометрію не завжди свідчить про його функціональну повноцінність.

В основу корисної моделі „Спосіб діагностики недостатності лютеїнової фази менструального циклу” поставлене завдання шляхом дослідження маркерів ангиогенезу ендометрію, а саме

(19) UA (11) 30766 (13) U

імуногістохімічною реакцією рівня експресії тромбоспондину в паренхіматозно - стромальних елементах органа покращити діагностику недостатності лютеїнової фази.

Поставлене завдання здійснюється „Способом діагностики недостатності лютеїнової фази менструального циклу”, що передбачає і гістологічне дослідження ендометрію, який відрізняється тим, що при імуногістохімічному дослідженні ендометрію визначають рівень експресії тромбоспондину в паренхіматозно - стромальних елементах ендометрію і при рівні активності процесу 2-3 бали діагностують недостатність лютеїнової фази, при рівні 0-1 бал - повноцінну лютеїнову фазу.

Спосіб здійснюється таким чином: біоптичний матеріал отримують штриховими зскрябами та методом аспіраційної біопсії в період з 22-24 доби циклу з використанням атравматичної аспіраційної юретки-пайпель „Pipelle de Cornier” - Франція. Пайпель - це одноразовий стерильний інструмент, який має вигляд гнучкого пластикового циліндра діаметром 2-5мм з боковими отворами на кінці. В циліндрі розташований поршень. Після введення пайпеля в порожнину матки поршень витягається на половину своєї довжини, що створює від'ємний тиск і сприяє попаданню тканини ендометрія з різних ділянок порожнини матки в циліндр. Фрагменти ендометрію фіксують в 10% розчині холодного нейтрального формаліну (рН 7,4) протягом 24 годин. Після дегідратації їх заливають у високо очищений парафін з полімерними добавками (Richard-Allan Scientific) при температурі не вище 60°C. З парафінових блоків на ротаційному мікромомі Microm HM 325 з системою переносу зрізів STS (Carl Zeiss, Німеччина) виготовляють серійні гістологічні зрізи товщиною (5±1мкм). Парафінові зрізи наносять на предметне скло з спеціальним адгезивним покриттям, далі депарафінують у ксилолі за стандартною схемою та проводили регідралізацію. При цьому зрізи піддають так званій, тепловій індукції епітопного повернення (HER). Для демаскування антигенів (відновлення антигенної структури) регідратовані зрізи підлягали термічній обробці в розчині Target Retrieval Solution (DAKO, Данія) і прогріванню їх на водяній випарній бані GFL 1023 при t -90-95° протягом 20-30 хвилин або у мікрохвильовій печі з урахуванням рекомендацій фірми виробника антитіл. Після блокування неспецифічного зв'язування білка протеїновим блоком (DAKO) та ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком (DAKO) проводять трьохетапну імуоферментну реакцію.

Інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом в балах, від 0 до 3:

- 1) 0 балів - відсутнє видиме забарвлення;
- 2) 1 бал - слабе забарвлення;
- 3) 2 бали - помірне забарвлення;
- 4) 3 бали - виразне забарвлення.

При імуногістохімічному дослідженні експресія тромбоспондину виявлялась у вигляді гранул в цитоплазмі епітелію залоз, фібробластах, а також у фібрилярних структурах екстра целюлярного матриксу ендометрія.

В ендометрії жінок в лютеїнову фазу LH +7-8 спостерігалась вогнищева експресія тромбоспондину в цитоплазмі епітелію залоз. Як правило білок виявлявся в поодиноких клітинах залоз (Фіг. 1).

Такі залози мали переважно округлу або видовжену форму, без бокових розгалужень та вибухаючих епітеліальних сосочків, показник рівня експресії коливався від 0 до 1 бала.

В переважній більшості ендометріальних залоз з боковими розгалуженнями та вибухаючими епітеліальними сосочками в цитоплазмі епітелію відсутня експресія тромбоспондину як АВ-1 ізотипу Ig M АВ-7 ізотипу Ig G 2a (Фіг. 2).

Вогнищево виявлялась експресія тромбоспондину в цитогенних елементах строми. Як правило, тромбоспондин спостерігався в вогнищах з помірних або вираженим набряком строми. В таких ділянках серед стромальних клітинних елементів переважали фібробласти (Фіг. 3).

Кількісний рівень експресії тромбоспондину складав 1 бал.

В стромальних клітинних елементах ендометрію з добре розвинутими спіральними судинами з формуванням клубочків, з вираженою периваскулярною предецидуальною реакцією експресія тромбоспондину не спостерігалась (Фіг. 4). Рівень експресії TSP - 0 балів.

Клінічний приклад: Пацієнтка Лапковська О. Р., 1985 року народження, що мешкає у м. Вінниця по вул. Папаніна 3/53, звернулась у центр репродуктивної медицини „REMEDI” Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова з приводу звичного невиношування (2 самовільних викидні в терміні 7-8 тижнів в анамнезі) вагітності. Крім загально клінічного обстеження, пацієнтці були проведені функціональні проби. За графіками базальної температури виявлено скорочення тривалості та її схожодібний характер лютеїнової фази до 9 днів. При УЗ-дослідженні протягом менструального циклу з використанням кольорового Допплеровського ефекту встановлено відставання дозрівання ендометрію на протязі проліферативної фази та секреторних перетворень у лютеїнової фази, збільшення індексів резистентності в спіралеподібних маткових артеріях та зниження систолічної швидкості в судинах жовтого тіла. Пацієнтці проведено повне гормональне обстеження, в результаті якого встановлені базальні рівні гонадотропних гормонів: фолікулоstimулюючий (ФСГ) - 7,45mU/ml, лютеїнізууючий (ЛГ) - 2,89ml/ml; пролактину - 10,07ng/ml, естрадіолу (E2) - 31,73pg/ml; прогестерону - 26,43ng/ml. В аналізі виділень суттєвих змін виявлено не було: Лейкоцити - 5-10 в п/з, слиз - у невеликій кількості, флора - палички у невеликій кількості, ступінь чистоти - 3.

Після проведеного обстеження був виставлений діагноз: Звичне невиношування на тлі недостатності лютеїнової фази? З метою підтвердження діагнозу була проведена біопсія ендометрію в середині лютеїнової фази.

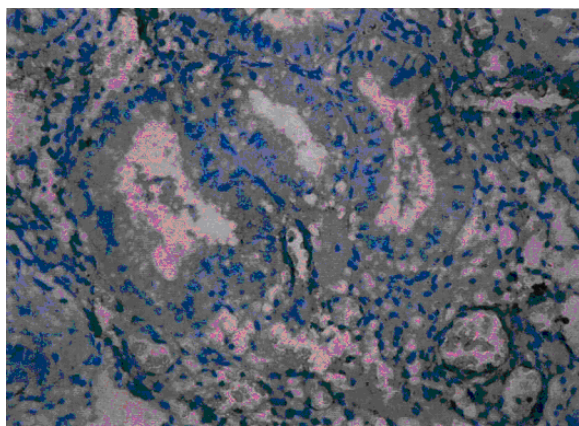
Результати дослідження біопсійного матеріалу показали, що рівень експресії тромбоспондину в паренхіматозно - стромальних елементах ендометрію складав 2 бали.

Клінічний приклад: Пацієнтка Кривенька Ю. А., 1983 року народження, що мешкає у м. Вінниці по вул. Боженова 6/1, звернулася у центр репродуктивної медицини „REMEDI" Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова зі скаргами на відсутність настання вагітності протягом 3 років, мажучі виділення на початку менструації. Після проведення обстежень було виявлено подовження тривалості 1-ї фази менструального циклу до 18 днів, вкорочення тривалості лютеїнової фази до 10 днів за даними базальної температури. При УЗ-дослідженні у середині лютеїнової фази: гіоплазія матки 1-го ступеня, товщина ендометрію - 7,8мм, ЛНФ 19мм. За даними гормонального обстеження встановлено підвищений рівень пролактину >200ng/ml (n=2,2-22) та дегідроепіандростерону 438,91mg/100ml (N=19-49), а також знижений рівень прогестерону у 2 фазі менструального циклу до 4,3ng/ml.

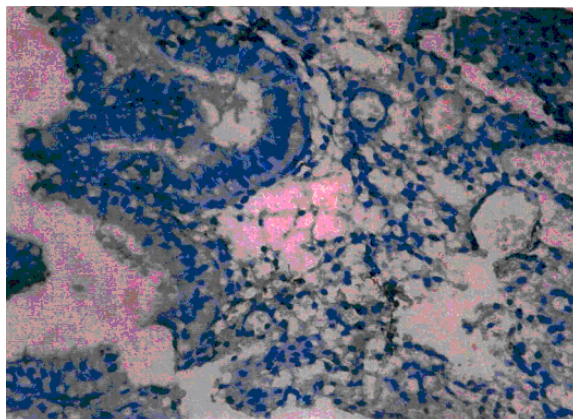
На базі проведених досліджень був виставлений діагноз: Первинне безпліддя. Недостатність лютеїнової фази на тлі гіперпролактинемії. Після проведеної відповідної гормональної корекції станів гіперпролактинемії та гіперандрогенії, рівень прогестерону та тривалість 2 фази менструального циклу за графіками базальної температури не змінилися, тому з метою підтвердження діагнозу недостатності лютеїнової фази рекомендовано проведення біопсії ендометрію в середині лютеїнової фази.

Результати дослідження біопсійного матеріалу показали, що рівень експресії тромбоспондину в паренхіматозно - стромальних елементах ендометрію складав 2-3 бали.

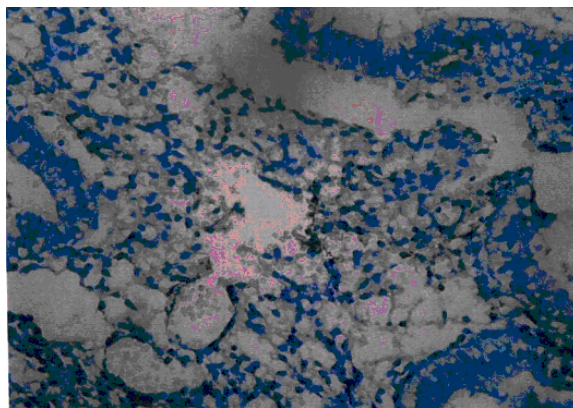
Після відповідного лікування жінка народила.



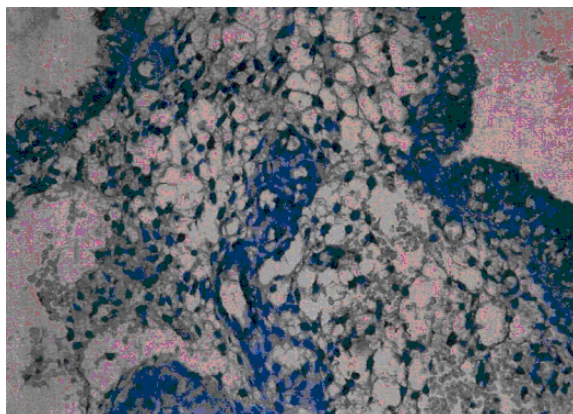
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4