



Оригинальная статья

Возможности и перспективы применения диагностической технологии QPI (количественный фазовый имиджинг) в акушерстве и гинекологии

Лифенко Р.А.¹ • Попова О.С.² • Топузов А.Г.³ • Звержховский В.Д.⁴

Актуальность. Важная роль иммунологических факторов в патогенезе эндометриоза позволяет рассматривать их в качестве диагностических и прогностических маркеров заболевания. Перспективный подход в диагностике иммунологических нарушений – неинвазивная клеточная диагностическая технология количественного фазового имиджинга (quantitative phase imaging – QPI), в основе которой лежат принципы лазерной интерферометрии и голографии. **Цель** – оценить возможности QPI для выявления диагностических критериев уровня нарушений в клеточном звене иммунной системы у пациенток с наружным эндометриозом. **Материал и методы.** Проведена количественная оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов периферической крови 22 пациенток с эндометриоидными кистами яичников (средний возраст $27,1 \pm 3,4$ года), 20 больных лейомиомой матки (средний возраст $29,3 \pm 4,1$ года) и 20 практически здоровых небеременных женщин фертильного возраста (средний возраст $28,7 \pm 3,6$ года) с использованием неинвазивной технологии количественного фазового имиджинга, реализованной на основе модуля

фазово-интерференционной микроскопии отечественного аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Весттрейд», Россия). **Результаты.** Изучены фазово-интерференционные портреты нативных лимфоцитов, выявлены морфологические и денситометрические особенности, характерные для клеток с фенотипом $CD4^+$ и $CD8^+$. В популяции цитотоксических лимфоцитов выделены 2 группы клеток, различающихся величинами фазовой толщины N_{cvt} и площади S_{cvt} примембранной области цитоплазмы, содержащей гранулы перфорины. Установлено, что в условиях физиологической нормы содержание перфорин-позитивных $CD8^+$ лимфоцитов, реализующих цитотоксический (перфориновый) потенциал, составляет $37,1 \pm 5,15\%$, у пациенток с эндометриозом – $29,8 \pm 6,34\%$, а с лейомиомой матки – $42,6 \pm 5,89\%$. **Обсуждение.** Оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов посредством количественного определения клеток, содержащих перфориновые гранулы, может служить важным диагностическим и прогностическим критерием течения заболевания. **Заключение.** Исследование внутриклеточных структур

лимфоцитов с использованием неинвазивной и безреагентной технологии QPI позволяет не только детально изучать патогенетические механизмы трансформации иммунокомпетентных клеток в условиях развития патологического процесса, но и в перспективе предложить новые подходы к функциональной диагностике состояния иммунной системы на основе полученных результатов.

Ключевые слова: фазово-интерференционная микроскопия, эндометриоидные кисты яичников, лимфоциты, цитотоксический потенциал, перфориновые гранулы

Для цитирования: Лифенко РА, Попова ОС, Топузов АГ, Звержховский ВД. Возможности и перспективы применения диагностической технологии QPI (количественный фазовый имиджинг) в акушерстве и гинекологии. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):758–64. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-758-764.

Поступила 02.05.2018;
принята к публикации 26.11.2018

Эффективная организация акушерско-гинекологической помощи населению непосредственным образом зависит не только от уровня квалификации специалистов, применения современных программ скрининга и рациональных схем лечения, но и от внедрения инновационных лечебно-диагностических технологий, которые позволяют оптимизировать процесс обследования пациентов, устранить возможные диагностические ошибки, снизить показатели гинекологической заболеваемости.

К одному из распространенных в мире гинекологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста относят эндометриоз. При этом, по мнению специалистов, наиболее часто

встречающимися формами заболевания вне зависимости от возраста, этнической принадлежности и социально-экономических условий считаются эндометриоидные поражения тела матки и яичников [1, 2]. Современная концепция патогенеза эндометриоза представляет его как генетически детерминированное хроническое дисгормональное и иммунозависимое заболевание с признаками автономного роста гетеротопий и нарушением функциональности клеток эндометрия [3–5].

Несмотря на активно проводимые междисциплинарные исследования, молекулярные механизмы прогрессирования эндометриоза остаются не ясными. Однако наличие местных и системных нарушений в иммунном ответе пациенток



является установленным. В работах отечественных и зарубежных авторов сообщается об изменении функциональной полноценности клеточных элементов иммунитета (макрофагов, моноцитов, лимфоцитов), увеличении секреции и синтеза провоспалительных медиаторов, факторов роста, наличии низкого уровня апоптоза и повышенной пролиферативной активности клеток [6–9]. Важная роль иммунологических факторов в патогенезе эндометриоза позволяет рассматривать их в качестве диагностических и прогностических маркеров заболевания. С этой целью предлагаются различные показатели, диагностические методы, новые алгоритмы обследования пациенток. Внедрение в практическое здравоохранение современных компьютерных технологий позволяет осуществлять диагностику патологического процесса на клеточном и субклеточном уровнях. Перспективным подходом в диагностике целого ряда заболеваний видится неинвазивная клеточная диагностическая технология количественного фазового имиджинга (quantitative phase imaging – QPI), в основе которой лежат принципы лазерной интерферометрии и голографии. Технология QPI в течение последних лет уже активно используется в практическом здравоохранении для исследования тромбоцитарного гемостаза при неразвивающейся беременности [10, 11], мониторингования морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток при эндометриозе [12–14] и др. Разработка новых технических решений, создание современных алгоритмов определения фазы и анализа изображений открывают новые перспективы применения технологии QPI в акушерско-гинекологической практике.

Цель настоящей работы – оценить возможности QPI для выявления диагностических критериев уровня нарушений в клеточном звене иммунной системы у пациенток с наружным эндометриозом.

Материал и методы

Исследованы клетки периферической крови 42 пациенток, составивших две клинические группы: в 1-ю группу (основную) были включены 22 пациентки с эндометриоидными кистами яичников в возрасте от 21 до 37 лет (средний возраст $27,1 \pm 3,4$ года); 2-ю группу (сравнения) составили 20 больных с лейомиомой матки в возрасте от 23 до 42 лет (средний возраст $29,3 \pm 4,1$ года). Всех пациенток привлекали к обследованию однократно до проведения хирургического лечения. Для определения показателей нормы (группа

Лифенко Роман Александрович – канд. мед. наук, главный врач¹
✉ 357202,
г. Минеральные Воды,
ул. Кисловодская, 59,
Российская Федерация.
Тел.: +7 (87922) 6 78 87.
E-mail: hadik202@gmail.com

Попова Ольга Сантроевна – аспирант кафедры акушерства и гинекологии факультета дополнительного последилового образования²

Топузов Александр Георгиевич – главный врач³

Звержовский Владислав Дмитриевич – инженер специализированной учебно-научной лаборатории когерентной фазовой микроскопии⁴

контроля) были изучены клетки периферической крови 20 практически здоровых небеременных женщин фертильного возраста (от 22 до 37 лет), не имевших на момент обследования острых и/или хронических гинекологических и соматических заболеваний. Средний возраст в группе контроля был $28,7 \pm 3,6$ года.

Критериями включения в исследование служили клинически и инструментально верифицированный диагноз эндометриоза яичников и лейомиомы матки, репродуктивный возраст.

Критериями исключения были эндометриоз других локализаций, наличие сопутствующих гинекологических заболеваний, злокачественные опухоли органов репродуктивной системы, отказ пациентки от участия в исследовании.

Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 38 от 29 мая 2014 г.) и проводились с получением добровольного и информированного согласия пациенток.

Венозную кровь из кубитальной вены заготавливали в пробирки вакуумные (VACUETTE) 13×100 мм с наполнителем с К2 ЭДТА. Взвесь мононуклеаров выделяли стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque ($p = 1,077$ г/см³). Получение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов из общей фракции мононуклеаров осуществляли методом магнитной сепарации по методике производителя (Miltenyi Biotech, Германия). К суспензии мононуклеарных клеток добавляли магнитные частицы, конъюгированные с анти-CD4 и анти-CD8 антителами соответственно, и инкубировали в течение 15 минут при +40 °С. Затем клетки отмывали и осуществляли выделение позитивных фракций с помощью магнитного сепаратора AutoMACS (Miltenyi Biotech, Германия). Чистота выделения во всех случаях составляла более 95%.

Исследования клеток проводили в режиме реального времени с использованием технологии количественного фазового имиджинга, реализованной на основе модуля фазово-интерференционной микроскопии отечественного аппаратно-программного комплекса «Биони» (ООО «Весттрейд», Москва) для клинической и лабораторной диагностики. Оптическая схема модуля представляет собой модификацию схемы микроинтерферометра Линника с источником света He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 1 мВт). Фазовый портрет живой функционирующей клетки получали путем преобразования цифровой матрицы распределения фаз полученного сигнала при сравнении волнового фронта, прошедшего через

¹ ГБУЗ СК «Минераловодская районная больница»; 357202, г. Минеральные Воды, ул. Гагарина, 67А, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России; 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310, Российская Федерация

³ ГБУЗ СК «Минераловодский межрайонный родильный дом»; 357200, г. Минеральные Воды, Февральский пер., 21, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; 119454, г. Москва, пр-т Вернадского, 78, Российская Федерация

клетку, с референтным, отраженным без искажений от высококачественного зеркала. В соответствии с протоколом технологии QPI получали 2D- и 3D-визуализацию клетки и ее фрагментов. Для каждой клеточной субпопуляции оценивали комплекс стандартных морфоденситометрических параметров. Показатель функциональной активности ядра (FA) лимфоцитов рассчитывали по формуле [15]:

$$FA = (3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1 + 0 \times n_0) / n,$$

где FA – функциональная активность ядра; n_3 – количество клеток с PH (фазовая высота) $\leq 1,5$ мкм; n_2 – с PH $> 1,5$, но ≤ 2 мкм; n_1 – с PH > 2 , но $\leq 2,5$ мкм; n_0 – с PH $> 2,5$; n – число клеток в выборке.

Количественную оценку цитотоксического потенциала лимфоцитов выполняли в соответствии с оригинальными алгоритмами определения параметров фазового изображения клеток [16].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 21.0. Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, а также величины дисперсии и стандартного отклонения. Сравнение показателей по количественным признакам осуществляли непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна – Уитни. При сравнении двух групп с нормальным характером распределения данных использовали t-тест для независимых группировок при условии совпадения дисперсий. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Морфологические особенности, характерные для клеток с фенотипом CD4⁺ и CD8⁺, выявлены при анализе фазово-интерференционных портретов нативных лимфоцитов. На топограммах и 3D-реконструкциях хорошо визуализируется круглое, овальное или бобовидное ядро с неоднородной глыбчатой структурой хроматина (рис. 1). Вокруг ядра ободок цитоплазмы, который может иметь различную ширину, что позволяет выделить узко- или широкоплазменные лимфоциты. В цитоплазме некоторых широкоплазменных лимфоцитов можно определить наличие зернистости.

Средние по популяции морфоденситометрические параметры CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов приведены в табл. 1. В контрольной группе CD4-позитивные клетки имели тенденцию

к снижению средних в популяции значений диаметра, периметра, высоты (фазовой толщины), площади и объема клеток по сравнению с CD8⁺ лимфоцитами. FAN клеток с фенотипом CD4⁺ составил 1,88, а с фенотипом CD8⁺ – практически

Таблица 1. Морфоденситометрические параметры лимфоцитов с фенотипом CD4⁺ и CD8⁺

Группа	Параметр, M ± σ				
	диаметр, мкм	периметр, мкм	высота, мкм	площадь, мкм ²	объем, мкм ³
Контроль					
CD4 ⁺	6,42 ± 0,49	18,35 ± 1,41	1,81 ± 0,29	35,98 ± 3,12	22,95 ± 4,78
CD8 ⁺	6,74 ± 0,85	18,93 ± 3,12	1,73 ± 0,31	39,15 ± 6,03	26,91 ± 5,12
Эндометриодные кисты яичников					
CD4 ⁺	6,73 ± 0,92	18,95 ± 2,28	1,64 ± 0,23*	32,64 ± 3,16	24,47 ± 3,12
CD8 ⁺	6,25 ± 0,98	19,42 ± 2,46	1,77 ± 0,15	35,72 ± 4,69	27,11 ± 5,34
Лейомиома матки					
CD4 ⁺	6,59 ± 0,78	19,11 ± 2,35	1,78 ± 0,31	37,25 ± 3,41	22,41 ± 3,31
CD8 ⁺	7,15 ± 1,03	20,95 ± 3,04	1,66 ± 0,28	41,3 ± 5,24	28,35 ± 3,46

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями контроля

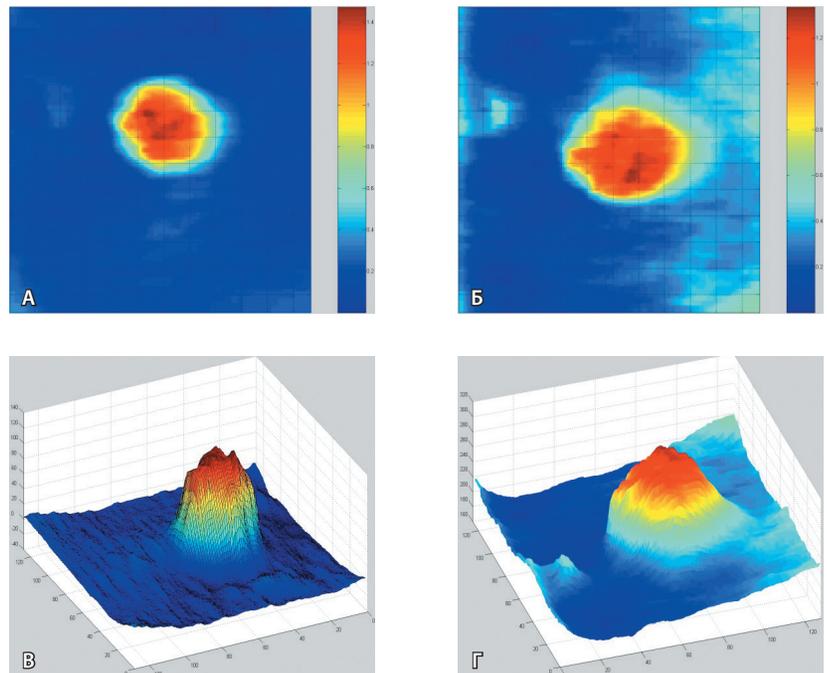


Рис. 1. Фазово-интерференционные портреты Т-лимфоцитов периферической крови (интерференционное поле 20 × 20 мкм): топограммы в псевдоцвете узкоплазменного (А) и широкоплазменного (Б) лимфоцитов; 3D-реконструкции узкоплазменного (В) и широкоплазменного (Г) лимфоцитов



на 5,1% больше (1,98). Данный факт может свидетельствовать о несколько более высокой функциональной активности цитотоксических лимфоцитов.

Для морфоденситометрических параметров CD4⁺ лимфоцитов периферической крови пациенток с эндометриоидными кистами яичников характерна тенденция к незначительному увеличению средних в популяции значений диаметра,

Таблица 2. Показатели фазовой толщины ($H_{\text{цит}}$) и площади ($S_{\text{цит}}$) зоны тонкой цитоплазмы цитотоксических лимфоцитов

Группа	Параметр, $M \pm \sigma$	
	фазовая толщина, мкм	площадь, мкм ²
Контроль	$0,63 \pm 0,08$	$37,5 \pm 7,25$
Эндометриоидные кисты яичников	$0,54 \pm 0,09^*$	$34,9 \pm 6,83$
Лейомиома матки	$0,69 \pm 0$	$40,1 \pm 8,12$

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями контроля

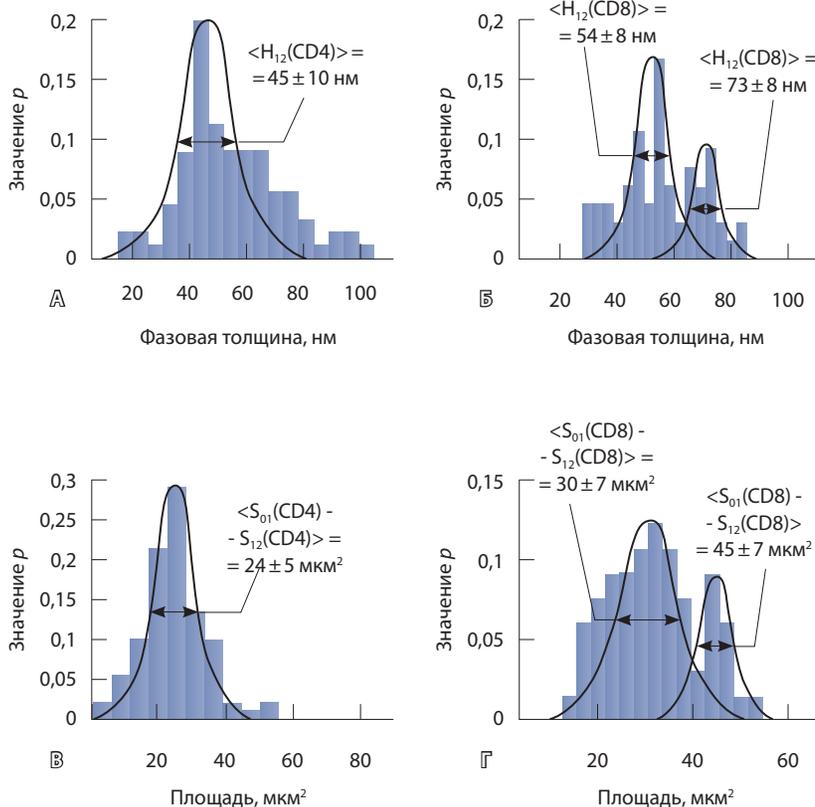


Рис. 2. Гистограммы распределения CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов периферической крови по величинам фазовой толщины ($H_{\text{цит}}$) (А, Б) и площади ($S_{\text{цит}}$) (В, Г) примембранной зоны цитоплазмы ($M \pm \sigma$). В популяции CD8⁺ клеток выделены две отдельные группы лимфоцитов, различающиеся значениями $H_{\text{цит}}$ (Б) и $S_{\text{цит}}$ (Г)

периметра и площади клеток ($p > 0,05$). Фазовая высота (толщина) снизилась на 9,4% по отношению к показателям контрольной группы. В субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов, напротив, диаметр, периметр и площадь клеток оказались несколько меньше контрольных значений, а фазовая высота (толщина) и объем имели тенденцию к повышению. FAN клеток с фенотипом CD4⁺ был 2,03. Снижение величины FAN у CD8⁺ лимфоцитов до 1,91 может свидетельствовать о подавлении функциональной активности цитотоксических клеток.

У пациенток с лейомиомой матки не выявлено значимых изменений параметров CD4⁺ лимфоцитов. FAN составил 1,85. В субпопуляции клеток с фенотипом CD8⁺ зарегистрирована тенденция к увеличению диаметра, периметра и площади ($p > 0,05$), средние значения фазовой высоты (толщины) клеток были снижены на 7%. FAN CD8⁺ клеток увеличился до 2,08, демонстрируя повышение функциональной активности цитотоксических лимфоцитов.

Методом интегральных функций оценили денситометрические особенности плазменной примембранной области CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. В качестве информативных параметров использовали величины фазовой толщины $H_{\text{цит}}$ и площади $S_{\text{цит}}$ зоны тонкой цитоплазмы, прилегающей к мембране клетки и содержащей гранулы (рис. 2).

Гистограмма распределения CD4⁺ клеток по величине $S_{\text{цит}}$ подчиняется нормальному закону и имеет унимодальную симметрическую форму. В гистограмме распределения по величине $H_{\text{цит}}$ при сохранении унимодального характера отмечается незначительная правосторонняя асимметрия.

Гистограммы распределения CD8⁺ лимфоцитов по анализируемым показателям, напротив, имеют выраженную бимодальность, демонстрируя наличие в популяции цитотоксических лимфоцитов двух групп клеток, различающихся величинами $H_{\text{цит}}$ и площадью $S_{\text{цит}}$.

В табл. 2 приведены средние значения фазовой толщины $H_{\text{цит}}$ и площади $S_{\text{цит}}$ зоны тонкой цитоплазмы цитотоксических лимфоцитов у обследованных пациенток.

Подсчет процента цитотоксических клеток с наличием гранул показал, что в контрольной группе содержание CD8⁺ лимфоцитов с наличием гранул в примембранной зоне тонкой цитоплазмы составило $37,1 \pm 5,15\%$, в группе пациенток с эндометриоидными кистами яичников – $29,8 \pm 6,34\%$, а у женщин с лейомиомой матки – $42,6 \pm 5,89\%$.



Обсуждение

Последние десятилетия ознаменовались значительным прогрессом в изучении молекулярной биологии клетки. Новые возможности связаны с развитием так называемых омиксных технологий: геномики, протеомики, метаболомики, эпигеномики, фармакомики, предназначенных для оптимизации профилактики, диагностики и лечения пациентов. В проведенном исследовании мы использовали новую диагностическую технологию, реализованную на базе когерентной интерференционной микроскопии, для неинвазивного изучения субклеточных структур иммунокомпетентных клеток при эндометриозе.

Полученные нами результаты показали, что в условиях физиологической нормы популяция CD4⁺ лимфоцитов была достаточно однородной по анализируемым морфоденситометрическим параметрам. Клеток, содержащих гранулы, не выявлено. В то же время практически 37% CD8⁺ лимфоцитов были перфоринпозитивными. Эти данные полностью согласуются с результатами других исследователей [17–19].

Экзоцитоз перфорины и гранзимов, содержащихся в литических цитоплазматических гранулах, выступает одним из основных механизмов реализации лимфоцитами цитотоксической способности. В результате взаимодействия цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью свободный перфорин встраивается в мембрану клетки-мишени с последующей полимеризацией в присутствии ионов Ca²⁺ и образованием многочисленных трансмембранных пор, приводящих к осмотическому взрыву и лизису клетки. Гранзимы, проникая через образовавшиеся поры внутрь клетки-мишени, активируют эффекторный фермент каспазу-3 и вызывают деградацию ДНК, тем самым завершая необратимое разрушение клетки [17–20].

У женщин с эндометриозом наблюдаются качественные и количественные изменения макрофагов, подавление функции NK-клеток, снижение цитотоксической активности, нарушение процессов пролиферации и апоптоза [6, 21].

Литература

1. Адамьян ЛВ, ред. Сочетанные доброкачественные опухоли и гиперпластические процессы матки (миома, аденомиоз, гиперплазия эндометрия). Проект клинических рекомендаций по ведению больных. М.; 2015. 94 с.
2. Прилепская ВН, Иванова ЕВ, Тагиева АВ, Летуновская АБ. Эндометриоз: от трудностей

- диагностики к новым возможностям терапии. Гинекология. 2012;14(4):4–8.
3. Подзолкова НМ, Колода ЮА, Коренная ВВ. Наружный генитальный эндометриоз: взгляд репродуктолога. Фарматека. 2012;12(245):64–71.
4. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil

В ряде исследований выявлена прямая зависимость между уровнем цитотоксичности и тяжестью заболевания [21, 22].

Согласно нашим данным, количество CD8⁺ лимфоцитов с наличием перфориновых гранул при эндометриозе оказалось сниженным, что свидетельствует о низком цитотоксическом (перфориновом) потенциале иммунной системы у обследованных пациенток и, по-видимому, служит объяснением прогрессирующего и рецидивирующего характера заболевания. Следовательно, оценка цитотоксического потенциала лимфоцитов посредством количественного определения клеток, содержащих перфориновые гранулы, с использованием современной диагностической технологии QPI может служить важным диагностическим и прогностическим критерием течения заболевания.

Заключение

Установлены и количественно оценены особенности цитотоксического потенциала лимфоцитов периферической крови больных эндометриозом: подавление функциональной активности CD8-позитивных клеток, снижение уровня лимфоцитов, содержащих в цитоплазме перфориновые гранулы.

Исследование внутриклеточных структур лимфоцитов с использованием неинвазивной и безреагентной технологии QPI может позволить не только детально изучать патогенетические механизмы трансформации иммунокомпетентных клеток в условиях развития патологического процесса, но и на основе полученных результатов в перспективе разрабатывать новые подходы к функциональной диагностике состояния иммунной системы, предлагать доступные, информативные и объективные биомаркеры для прогноза течения и исхода заболевания, заложить основы принципиально новой тактики лечения при той или иной форме эндометриоза, модулируя цитотоксический потенциал иммунной системы пациента. ©

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.



6. Алексанова ЕМ, Аксененко ВА, Пилавова ОМ. Изменения местного иммунитета у пациенток с эндометриодными кистами яичников на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани. *Фундаментальные исследования*. 2014;(10–2): 245–50.
7. Линде ВА, Ермолова НВ, Колесникова ЛВ, Слесарева КВ, Ширинг АВ, Скачков НН. Содержание клеточных биорегуляторов в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у женщин при формировании эндометриодных кист яичников. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2012;(3): 58–64.
8. Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017;8(4):7138–47. doi: 10.18632/oncotarget.12577.
9. Mu F, Harris HR, Rich-Edwards JW, Hankinson SE, Rimm EB, Spiegelman D, Missmer SA. A prospective study of inflammatory markers and risk of endometriosis. *Am J Epidemiol*. 2018;187(3):515–22. doi: 10.1093/aje/kwx272.
10. Гаспарян СА, Чотчаева СМ, Василенко ИА, Кастрикина ИС. Структурно-морфологические особенности тромбоцитов периферической крови при неразвивающейся беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2009;LVIII(3):7–11.
11. Ордианц ИМ, Побединская ОС, Макаева ДА, Алиева ЭА. Цитоморфометрическое прогнозирование невынашивания ранней беременности. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2014;(2):108–11.
12. Василенко ИА, Кардашова ЗЗ, Тычинский ВП, Вишенская ТВ, Лифенко РА, Валов АЛ, Иванюта ИВ, Агаджанян БЯ. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии. *Вестник последипломого медицинского образования*. 2009;(3–4):64–8.
13. Лысенко МА, Метелин ВБ, Баранова НВ. Опыт применения инновационных клеточных технологий в диагностике эндометриодных кист яичников. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012;2(26):33–6.
14. Chang CW, Cheong ML, Chang GD, Tsai MS, Chen H. Involvement of Epac1/Rap1/CaMKI/HDAC5 signaling cascade in the regulation of placental cell fusion. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(11):745–55. doi: 10.1093/molehr/gat050.
15. Цалман АЯ, Ватазин АВ, Василенко ИА, Метелин ВБ, Вышенская ТВ. Интерференционная фазометрия ядерных структур лимфоцитов при трансплантации почки. *Клиническая нефрология*. 2010;(6):43–7.
16. Вышенская ТВ, Болотова АА, Василенко ИА, Звержховский ВД, Болдырев ДВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Метод определения цитотоксического потенциала по фазовым изображениям CD8⁺ лимфоцитов. *Биофизика*. 2016;61(3):523–7.
17. Кадагидзе ЗГ, Заботина ТН, Короткова ОВ, Табаков ДВ, Черткова АИ, Борунова АА, Панчук ИО, Самойленко ИВ, Харкевич ГЮ, Демидов ЛВ. Влияние ипилимумаба на субпулционную структуру лимфоцитов больных диссеминированной меланомой. *Практическая онкология*. 2017;18(3):285–97.
18. Борунова АА, Чкадуа ГЗ, Заботина ТН. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16⁺-лимфоцитов. *Иммунология*. 2006;27(1):4–6.
19. Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, House CM, Chia J, Darcy PK, Yagita H, Trapani JA. Blood Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. 2007;110(4):1184–90. doi: 10.1182/blood-2007-02-072850.
20. Moreno-Hagelsieb G, Vitug B, Medrano-Soto A, Saier MH Jr. The Membrane Attack Complex/Perforin Superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2017;27(4):252–67. doi: 10.1159/000481286.
21. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60(5):383–404.
22. Jeung I, Cheon K, Kim MR. Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2916070. doi: 10.1155/2016/2916070.
1. Adamyan LV, editor. Combined benign tumors and hyperplastic processes of the uterus (myoma, adenomyosis, endometrial hyperplasia). *Draft clinical guidelines for managing patients*. Moscow; 2015. 94 p. Russian.
2. Prilepskaya VN, Ivanova EV, Tagieva AV, Letunovskaya AB. Endometriosis: from the difficulties of diagnosis to new possibilities of therapy. *Gynecology*. 2012;14(4):4–8. Russian.
3. Podzolkova NM, Koloda YuA., Korennaya VV. External endometriosis: reproductologist's view on the problem. *Pharmateca*. 2012;12(245):64–71. Russian.
4. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(3):511–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
5. Facchin F, Barbara G, Saita E, Mosconi P, Roberto A, Fedele L, Vercellini P. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2015;36(4):135–41. doi: 10.3109/0167482X.2015.1074173.
6. Алексанова ЕМ, Аксененко ВА, Пилавова ОМ. Local immunity changes in patients with endometrioid ovarian cysts on the background of undifferentiated connective tissue dysplasia. *Fundamental Research*. 2014;(10–2):245–50. Russian.
7. Linde VA, Ermolova NV, Kolesnikova LV, Slesareva KV, Shiring AV, Skachkov NN. Content of cell bioregulators in blood serum and in peritoneal fluid of women in the formation of ovarian endometrioid cysts. *Journal of Fundamental Medicine and Biology*. 2012;(3):58–64. Russian.
8. Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017;8(4):7138–47. doi: 10.18632/oncotarget.12577.
9. Mu F, Harris HR, Rich-Edwards JW, Hankinson SE, Rimm EB, Spiegelman D, Missmer SA. A prospective study of inflammatory markers and risk of endometriosis. *Am J Epidemiol*. 2018;187(3):515–22. doi: 10.1093/aje/kwx272.
10. Gasparyan SA, Chotchaeva SM, Vasilenko IA, Kastrikina IS. Structural morphologic features of peripheral blood platelets in recurrent miscarriage. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2009;LVIII(3):7–11. Russian.
11. Ordyanets IM, Pobedinskaya OS, Makaeva DA, Alieva E.A. Cytomorphometry forecasting miscarriage early pregnancy. *Mother and Baby in Kuzbass*. 2014;(2):108–11. Russian.
12. Vasilenko IA, Kardashova DZ, Tychinsky VP, Vishenskaya TV, Lifenko RA, Valov AL, Ivanyuta IV, Agadzhanian BYa. Cell diagnostics: the potential of vital computed microscopy. *Journal of postgraduate medical education*. 2009;(3–4):64–8. Russian.
13. Lysenko MA, Metelyn VB, Baranova NV. New cellular technologies in diagnostics of endometrioid ovarian cysts. *Medical News of the North Caucasus*. 2012;2(26):33–6. Russian.
14. Chang CW, Cheong ML, Chang GD, Tsai MS, Chen H. Involvement of Epac1/Rap1/CaMKI/HDAC5 signaling cascade in the regulation of placental cell fusion. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(11):745–55. doi: 10.1093/molehr/gat050.
15. Tsalman AY, Vatazin AV, Vasilenko IA, Metelin VB, Vyshenskaya TV. Interference phaseometry of the lymphocyte nuclear structures after kidney transplantation. *Clinical Nephrology*. 2010;(6):43–7. Russian.
16. Vyshenskaya TV, Bolotova AA, Vasilenko IA, Zverzhovskiy VD, Boldyrev DV, Kretushev AV, Evdokimov AA. A technique for the assess-



ment of the cytotoxic capacity of CD8⁺ lymphocytes based on phase images. *Biophysics*. 2016;61(3):523–7. Russian.

17. Kadagidze ZG, Zabolina TN, Korotkova OV, Tabakov DV, Chertkova AI, Borunova AA, Panchuk IO, Samoilenko IV, Kharkevich GYu, Demidov LV. The effect of ipilimumab on the subpopulation structure of lymphocytes of patients with metastatic melanoma. *Practical Oncology*. 2017;18(3):285–97. Russian.
18. Borunova AA, Chkadua GZ, Zabolina TN. Perforin-mediated cytotoxicity of CD16⁺-lym-

phocytes. *Immunology*. 2006;27(1):4–6. Russian.

19. Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, House CM, Chia J, Darcy PK, Yagita H, Trapani JA. Blood. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. 2007;110(4):1184–90. doi: 10.1182/blood-2007-02-072850.
20. Moreno-Hagelsieb G, Vitug B, Medrano-Soto A, Saier MH Jr. The Membrane Attack Complex/Perforin Superfamily. *J Mol Mi-*

crobiol Biotechnol. 2017;27(4):252–67. doi: 10.1159/000481286.

21. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60(5):383–404.
22. Jeung I, Cheon K, Kim MR. Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2916070. doi: 10.1155/2016/2916070.

The potential and prospects of the quantitative phase imaging (QPI) diagnostic technology in obstetrics and gynecology

R.A. Lifenko¹ • O.S. Popova² • A.G. Topuzov³ • V.D. Zverzhovskiy⁴

Rationale: An important role of immunological factors in the endometriosis pathophysiology allows for their consideration as diagnostic and prognostic disease markers. A promising approach to the diagnosis of immunological abnormalities is based on the non-invasive cell diagnostic technology of quantitative phase imaging (QPI), with underlying principles of laser interferometry and holography. **Aim:** To assess the QPI potential to identify diagnostic criteria for cell immunity abnormalities in female patients with external endometriosis. **Materials and methods:** We performed a quantitative assessment of the cytotoxic potential of peripheral blood lymphocytes from 22 patients with endometrioid ovarian cysts (mean age, 27.1 ± 3.4 years), 20 patients with uterine leiomyoma (mean age, 29.3 ± 4.1 years) and 20 healthy non-pregnant women of child-bearing age (mean age, 28.7 ± 3.6 years). We used the non-invasive QPI technique with the module for phase interference microscopy of the Russian hard- and software complex Bioni (Westtrade Ltd., Russia). **Results:** We studied phase interference pictures of native lymphocytes to identify morphological and densitometry characteristics for CD4⁺ и CD8⁺ cells. Two groups of cells were identified in the cytotoxic lymphocyte population, which differed in their values of the phase thickness (H_{cyl}) and the area of cytoplasm adjacent to the membrane and containing the perforin granules (S_{cyl}). It was found, that in the

healthy controls the proportion of perforin-positive cytotoxic CD8⁺ lymphocytes was 37.1 ± 5.15%, in the patients with endometriosis 29.8 ± 6.34%, and in those with uterine leiomyoma 42.6 ± 5.89%. **Discussion:** Assessment of the lymphocyte cytotoxic potential by quantitative determination of cells containing perforin granules may be an important diagnostic and prognostic criterion of the disease course. **Conclusion:** Studies of the intracellular structures of lymphocytes by non-invasive and non-reagent technology QPI allows not only for a detailed evaluation of pathophysiological mechanisms of immune competent cell transformation in the course of a pathological process, but also gives future directions for development of new approaches to functional assessment of the immune system based on the results obtained.

Key words: phase interference microscopy, endometrioid ovarian cyst, lymphocyte, cytotoxic potential, perforin granules

For citation: Lifenko RA, Popova OS, Topuzov AG, Zverzhovskiy VD. The potential and prospects of the quantitative phase imaging (QPI) diagnostic technology in obstetrics and gynecology. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):758–64. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-758-764.

Received 02 May 2018; accepted 26 November 2018

Roman A. Lifenko – MD, PhD, Chief Physician¹

✉ 59 Kislovodskaya ul., Mineralnye Vody, 357203, Russian Federation. Tel.: +7 (87922) 6 78 87. E-mail: hadik202@gmail.com

Olga S. Popova – Postgraduate Student, Chair of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Postgraduate Education²

Aleksandr G. Topuzov – Chief Physician³

Vladislav D. Zverzhovskiy – Engineer, Specialized Educational and Scientific Laboratory of Coherent Phase Microscopy⁴

¹Mineralnye Vody District Hospital; 67A Gagarina ul., Mineralnye Vody, 357202, Russian Federation

²Stavropol State Medical University; 310 Mira ul., Stavropol, 355017, Russian Federation

³Mineralovodsk Interdistrict Maternity Hospital; 21 Fevral'skiy per., Mineralnye Vody, 357200, Russian Federation

⁴Moscow Technological University; 78 Vernadskogo prospekt, Moscow, 119454, Russian Federation

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.