

Endometrioosi ja kehalise aktiivsuse mõju naiste viljakusele

Tänapäeval lükatakse laste saamist edasi, kuna soovitakse esmalt teha karjääri, saavutada majanduslik kindlustatus ja leida sobiv elukaaslane. Paraku on naise kõige viljakamad eluaastad kahekümnendate esimene pool ja 35.–39. eluaastaks langeb naise viljakus juba pea kolmandiku võrra. Naise vanuse tõustes väheneb nii munarakkude arv kui nende kvaliteet, mis mõlemad suurendavad riski viljatuse tekkeks. Viljakust mõjutavad negatiivselt ka eluviisi tegurid, nagu ebatervislik toitumine, söömishäired, stress, suitsetamine, alkoholi liigtarvitamine, vähenenud kehaline aktiivsus ja suurenev keskkonnareostus. Lisaks vanusest tingitud viljakuse langusele on naisepoolse viljatuse sagedasemateks põhjusteks ovulatsioonihäired, endometrioos, munajuhade ja emakaga seotud haigused ning hüperprolaktineemia. Viljatust võivad põhjustada ka kromosoomimuutused ja immunoloogilised probleemid.

Üheks sagedaseks naisepoolse viljatuse põhjuseks on endometrioos, krooniline günekoloogiline haigus, mis mõjutab negatiivselt nii naiste tervist kui ka üldist elukvaliteeti. Endometrioosi korral migreeruvad emaka limaskestast sarnased rakud kõhuõõnde, kinnituvad seal ja hakkavad kolletena kasvama. Kõige sagedamini leiduvad endometrioosi kolDED väikese vaagna sidekoel, kõhukelmel, munasarjadel, aga ka soolte, emakakaelal, emaka lihaskihis, kusepõiel või operatsiooniarmites. Endometrioosi esineb umbes 10% viljakas eas naistel ja kuni 50% viljatutel naistel. Kuidas täpselt endometrioos viljatust põhjustab ei ole teada, aga arvatakse, et rolli võivad mängida nii munarakkude halvenenud kvaliteet kui ka häirunud endomeetriumi retseptiivsus. Endometrioosiga seotud viljatuse ravi on keeruline ja koosneb peamiselt kirurgilisest ravist, hormonaalsest ravist või nende kombinatsioonist ning sageli on vajalik kasutada ka *in vitro* viljastamise (IVF) protseduuri. Kuna endometrioos on väga mitmekesise haigusvormiga, ei ole ka kõigile patsientidele sobivat universaalset raviskeemi ja seetõttu on vajalikud edasised uuringud parimate ravivõimaluste leidmiseks. Uute endometrioosi diagnoosimise- ja ravivõimaluste leidmist takistavad ka ebapiisavad teadmised selle haiguse patogeneesi molekulaarsetest mehhanismidest.

Viljatuse ravi edukus IVF abil on nii viljatuse põhjusest, partnerite vanusest, sugurakkude ja embrüote kvaliteedist, endomeetriumi retseptiivsusest kui ka valitud raviskeemi sobivusest. Endomeetriumi retseptiivsus on oluline aspekt rasestumisel ja sellega seotud geenide ekspressiooni uurimine on märkimisväärse tähtsusega. Samuti ei tohi alahinnata elustiili mõju ravi edukusele ja patsiente tuleb nõustada nii raviaegse toitumise, suitsetamise, ravimite tarbimise kui ka füüsilise aktiivsuse mõjude suhtes. Viimase faktori suhtes ei ole üheseid seisukohti, on nii soovitusi füüsilist aktiivsust vähendada kui ka jätkata normaalset aktiivset elustiili. Objektive soovituste andmiseks on väga oluline teostada uuringuid kasutades näiteks otsest füüsilise aktiivsuse mõõtmist aktiseleromeetriga ja mitte tugineda ainult inimeste ütlusepõhiste andmetele.

Uuringu eesmärk

Antud doktoritöö põhieesmärk oli välja selgitada endometrioosi erinevate raviskeemide ja füüsilise aktiivsuse mõju IVF ravi edukusele viljatusravi läbivatel patsientidel ning hinnata endomeetriumi retseptiivsust ja molekulaarsete muutuste ulatust endometrioosi korral.

Uuringu alameesmärgid on:

1. Analüüsida kombineeritud ravi (laparoskoopia, GnRHa ja IVF) tõhusust endometrioosiga seotud viljatuse ravis erineva raskusastmega haiguse korral.
2. Hinnata objektiivselt mõõdetud füüsilise aktiivsuse mõju IVF ravi tulemustele.
3. Hinnata, kas endometrioosi korral on endomeetriumi retseptiivsuse geenide ekspressioonimuster muutunud ja kasutada sama geenipaneeli endomeetriumi koeproovide menstruaaltsükli faasi täpsustamiseks.
4. Selgitada välja endometrioosi kolletes toimunud molekulaarseid muutusi, kasutades selleks tsütotoksiliste ühendite tundlikkuse testimist.

Materjal ja meetodika

Uuringud on kooskõlastanud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee (kooskõlastused 191T-8, 227/T-7 ja 276/M-13) ja uuringusse värvatud naised allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi.

Uuringus osalenud patsiendid

Retrospektiivses uuringus I osales 179 Elite kliinikus kirurgiliselt ja histoloogiliselt kinnitatud endometriooosi diagnoosiga patsienti. Tuginedes Ameerika Reproduktiivmeditsiini klassifikatsioonile (1996) jaotati patsiendid sõltuvalt endometriooosi raskusastmest gruppidesse. Uuringus I jaotusid patsiendid: grupp 1 – minimaalne-kerge, I–II astme endometriooos – 121 patsienti ja grupp 2 – mõõdukas-raske, III–IV astme endometriooos – 58 patsienti. Grupp 1 ja grupp 2 patsiendid jaotati omakorda vastavalt GnRHa ravi järgi, kas GnRHa ravi toimus või mitte. Grupp 2-s olid kõik patsiendid saanud GnRHa ravi. Ravi järgselt sai patsient vastavalt operatsiooni leiule, varasemale anamneesile ja seemnerakkude analüüsi tulemusele soovitusel rasestumiseks spontaanselt või IVF teel. Uuringus osalenud patsiente jälgiti kuni sünnituseni.

Uuringus II osales 101 reproduktiivses eas viljatuse diagnoosiga naist, kes läbisid IVF viljatusravi protseduuri Elite kliinikus või Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) naistekliinikus. Embrüo siirdamine toimus teisel kuni viiendal päeval. Rasedust diagnoositi inimese koorioni gonadotropiini (hCG) analüüsi abil 14±2 päeva peale siirdamist. Positiivse hCG tulemuse korral kontrolliti kliinilise raseduse olemasolu ultraheli abil 4–5 nädalat peale munarakkude punktsiooni. Füüsilist aktiivsust mõõdeti ActiGraph GT2X+ aktseleeromeetri ehk väikese vöö kantava seadeldise abil, mis registreerib kandja kõik liikumisintensiivsused. Mõõtmisi teostati kolmel korral 14 järjestikuse päeva jooksul – enne kehaväliselt viljastamist, selle ajal ja juhul kui naine rasestus, siis ka kaks nädalat peale rasestumist. Analüüsis kasutati nende naiste andmeid, kes kandsid aktseleeromeetrit vähemalt 10 tundi päevas neli või rohkem päeva (N=98). Naistel paluti täita ka küsimustik n.ö. ekraaniaja kohta (televisioon, DVD, arvuti kasutamine) viimase viie tööpäeva kohta ja eraldi nädalavahetuse kohta.

Uuringus III osales 45 endometriooosiga ja 33 endometriooosita ning uuringus IV 11 endometriooosiga patsienti, kes värvati TÜK naistekliinikus endometriooosi kahtluse või viljatuse tõttu laparoskoopilisele operatsioonile suunatud naiste hulgast.

Uuringus III osales 25 I–II astme ja 20 III–IV astme endometriooosiga naist. Uuringus IV osales 7 I astme ja 4 III astme endometriooosiga patsienti. Kõik uuringus osalenud naised olid reproduktiivses eas (vanus 18–42 aastat) ja polnud vähemalt kolm kuud enne operatsiooni saanud hormoonravi. Kõikidelt värvatud patsientidelt uuringutes III ja IV koguti operatsiooni käigus Pipelle kogumiskateetrit kasutades endomeetriumi biopsia ja endometriooosiga patsientidelt koguti lisaks operatsiooni käigus eemaldatud kolded (uuring IV).

In vitro rakukultuuri katsed (uuring IV)

Strooma rakud eraldati endomeetriumi ja endometriooosi kollete biopsiamaterjalist ja kultiveeriti 5–6 passaaži DMEM/Ham's F-12 söötmes koos 10% FBS, penitsilliini, streptomütsiini ja amfoteritsiin B-ga inkubaatoris 37 °C juures 5% CO₂ tingimustes. Nii endomeetriumi kui endometriooosi kolletest eraldatud kultiveeritud strooma rakkudele lisati 14 erinevat tsütotoksilist ühendit (uuring IV, Tabel 1 vastavas publikatsioonis) ja teostati nekroosi/apoptoosi ja rakkude elulemuse määramise katsed.

RNA eraldamine ja geeniekspressiooni määramine (uuringud III ja IV)

Totaalne RNA eraldati endomeetriumi koest ja kultiveeritud strooma rakkudest kasutades kommertsiaalset komplekti RNeasy Mini kit. DNase I töötlus viidi läbi kasutades komplekti DNA-free DNA removal kit. Eraldatud RNA kontsentratsioon ja puhtus mõõdeti 2200 TapeStation süsteemiga. Kvantitatiivne reaalaeg PCR viidi läbi kasutades 7500 Fast Real-Time PCR System aparatuuri.

Endomeetriumi ja endometriooosi kollete kultiveeritud rakkude kogu transkriptoomi sekveneerimiseks loodi raamatukogud kasutades Nextera XT Library Prep komplekti (uuring IV) ja endomeetriumi retseptiivsust näitavate geenide tasemetel tuvastamine viidi läbi kasutades TAC-seq tehnoloogiat (uuring III). Sekveneerimise tulemusel saadud lugemid analüüsiti Priit Paluoja, MSc (Tartu Ülikool, arvutiteaduse instituut) või Alvin Meltsov, MSc (Tartu Ülikool, Molekulaar- ja rakubioloogia instituut) poolt.

Tulemused

Antud doktoritöö raames tehtud uuringute tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Retrospektiivse uuringu tulemused näitasid, et mõõduka-raske astme endometrioosiga patsiendid (grupp II) on saanud rohkem postoperatiivset GnRHa ravi ($p=0,021$) kui kergema astme endometrioosiga patsiendid (grupp I) ja üle 75% nendest patsientidest läbisid IVF ravi. Kõikidest uuritavatest rasestus kokku 119 naist (66.5%), kellest 33 (18.4%) rasestus spontaanselt ja 86 (48.0%) IVF abil. Kuigi kergema endometrioosi raskusastmega patsiendid rasestusid sagedamini spontaanselt ja raskema endometrioosi raskusastmega patsiendid rasestusid sagedamini IVF abil, siis vastavad erinevused ei olnud statistiliselt olulised. Samas saadi kergema astme endometrioosiga naistelt rohkem munarakke IVF tsükli, võrreldes raskema astme haigusega naistega ($p=0,008$). Üldine rasestumise, sünnitamise ja raseduste katkemiste protsent ei erinenud oluliselt ei grupi I siseselt sõltuvalt GnRHa ravi saamisest ega ka gruppide vahel.
2. Füüsilise aktiivsuse ja viljatusravi tulemuslikkuse uuringust selgus, et naised vähendavad oluliselt oma füüsilist aktiivsust kehavälise viljastamise ajal. Samas leidsime, et füüsilise aktiivsuse määr ei olnud seotud rasestumisega edukusega. Küll aga õnnestus füüsiliselt aktiivsematel naistel munasarjade stimulatsiooni järgselt saada rohkem munarakke (+2) ja embrüoid (+1) võrreldes nendega, kes vähendasid viljatusravi ajal oma füüsilist aktiivsust.
3. Endomeetriumi retseptiivsuse geenide avaldumise uuringust selgus, et nende geenide ekspressioon on endometrioosiga ja endometrioosita naistel sarnane ja kõige enam mõjutatud naise menstruaaltsükli faasist endomeetriumi koe kogumise ajal. Koeproovid jaotusid retseptiivsuse geenide avaldumise taseme järgi üsna selgelt menstruaaltsükli spetsiifilistesse gruppidesse (menstruaalfaas, proliferatiivne, vara-, kesk- ja hilissekretoorne). Vara- ja kesksekretoorsed proovid ei eristunud omavahel selgelt, sest nende faaside üleminek sõltub menstruaaltsükli kestvusest ja ütlusepõhise menstruaaltsükli päeva järgi ei ole võimalik seda väga täpselt määrata. Samal põhjusel klasterdusid mitmed hilissekretoorses faasis kogutud proovid koos menstruaalfaasi või kesksekretoorse faasi proovidega. Masinõppe tugivektorklassifitseerija mudeli abil, mis oli treenitud eristama vara- ja kesksekretoorseid endomeetriumi proove, oli võimalik eristada ka nende kahe kõrvutise faasi endomeetriumi biopsiaid.
4. Tsütotoksilised ühendid mõjutavad endomeetriumi stroomarakkude elulemust oluliselt rohkem võrreldes endometrioosikolde rakkudega. Neljateistkümnest kasutatud ühendist ainult üks, doksorubitsiin vähendas kolde stroomarakkude elulemust oluliselt tugevamalt võrreldes endomeetriumi rakkudega. Doksorubitsiiniga töötlemine mõjutas erinevalt ka endomeetriumi ja endometrioosikollete stroomarakkude geeniekspressiooni, nii et endomeetriumi rakkudes oli võrreldes koldega toimunud tunduvalt rohkem geenide avaldumise muutusi (vastavalt 4009 ja 249). Doksorubitsiini mõjul toimus mitmete geenide ekspressiooni vähenemine (näiteks *DKK1*, *HAS2*) nii endomeetriumi kui kolde rakkudes, aga näiteks *HIST1H2AE*, *HIST1H2BK* ja *HIST2H2AA4* ekspressioon tõusis doksorubitsiini mõjul endomeetriumi rakkudes, samas kui kolderakkudes nende geenide avaldumine ei muutunud. Kolme geeni korral (*PTN*, *HSPA2* ja *PTGS2*) kinnitati geeniekspressiooni muutused reaal-aja PCR meetodil.

Järeldused

1. Erineva raskusastme endometrioosiga naiste viljatusravis kasutatud strateegia, kas ainult laparoskoopiline kollete eemaldamine või laparoskoopia kombineeritult GnRHa raviga, ei mõjutanud oluliselt rasestumise ja sünnituseni jõudmise määra loomuliku ja IVF rasestumise korral. Viie aasta jooksul rasestus mõlemas grupis enam kui 60% naistest ja sünnitas lapse enam kui 50% naistest.
2. Viljatusravi läbivate naiste üldine kehaline aktiivsus IVF ravi ajal mõjutab positiivselt munasarja stimulatsiooni tulemusi, aga ei mõjuta embrüo implantatsiooni ega rasestumise tõenäosust. Seega

võib soovitada IVF ravi läbivatele naistele ravi ajal füüsilist aktiivsust mitte vähendada, vaid jätkata oma tavapärase aktiivse eluviisiga.

3. Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geenide ekspressioon ei erine endometrioosiga ja endometrioosita naistel. Samade geenide ekspressiooniprofiil võimaldab määrata varem kogutud endomeetriumi biopsiate menstruaaltsükli faasi. Antud tulemus on väga oluline arhiveeritud endomeetriumi proovide kasutamisel teadustöös.
4. Endomeetriumi rakud on tsütotoksilistele ühenditele palju tundlikumad kui endometrioosi kolde rakud. Kogu transkriptoomi sekveneerimise tulemused kinnitasid erinevat geeniekspressiooni endomeetriumi ja peritoneaalsete endometrioosi kollete rakkude vahel ja tõi esile geenid, mis võivad olla vastutavad endomeetriumi rakkude muutunud omaduste eest emakavälistes kolletes. Kolderakkude suurem tundlikkus doksorubitsiini suhtes tuleneb ilmselt teatud geenide juba algselt madalamast avaldumistasemest, mis vähendab resistentsust doksorubitsiinile.

Kokkuvõtteks võib öelda, et meie uuringute tulemustel on oluline kliiniline väljund, sest need aitavad otsustada endometrioosiga naistele sobiva viljatusravi strateegiate valimisel ja võimaldavad anda teaduspõhiseid elustiili soovitusi viljatusravi läbivatele naistele. Meie tulemused viivad sammu lähemale ka endometrioosiga seotud teaduslike probleemide lahendamisele, samas tuleb tõdeda, et selles vallas on vaja teha veel palju edasist uurimistööd, enne kui neid teadmisi saab rakendada patsientide heaolu suurendamiseks ja ravitulemuste parandamiseks.