

В. Н. Эллиниди,  
Н. И. Давыдова,  
Н. М. Калинина,  
Е. А. Михнина,  
О. А. Добротворцева

Всероссийский центр экстренной  
и радиационной медицины МЧС  
России. Санкт-Петербург;  
Научно-исследовательский институт  
акушерства и гинекологии  
им. Д.О. Отта РАМН,  
Санкт-Петербург

## СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

■ Исследовали показатели местного иммунитета иммуногистохимическим методом в эндометрии от 151 женщины с морфологическими проявлениями хронического эндометрита. Для подтверждения воспалительного процесса и уточнения его характера были изучены параметры системного иммунитета. По изменениям параметров местного иммунитета были выделены три группы пациенток. Определение параметров системного иммунитета позволило подтвердить хронический эндометрит у всех женщин и выявить группу с аутоиммунным характером воспаления.

### Актуальность проблемы

Проблема изучения воспалительных заболеваний эндометрия у женщин репродуктивного возраста является актуальной, так как вызывает не только нарушение менструальной, но и репродуктивной функции. Частота встречаемости хронического эндометрита при бесплодии колеблется от 20 до 60% [5], при привычном невынашивании беременности — от 60,5 до 86,7% [1]. Клинические проявления хронического эндометрита неспецифичны, заболевание часто диагностируется случайно при скрининговом обследовании женщин.

Для диагностики хронического эндометрита используется, как правило, гистологический метод, учитывающий совокупность морфологических признаков хронического воспаления: наличие очаговой лимфолейкоцитарной инфильтрации, очагового или диффузного фиброза стромы; присутствие плазматических клеток и склеротические изменения стенок спиральных артерий [6, 3]. Наличие только одного или двух вышеописанных критериев воспаления вызывает сомнение у морфологов в постановке диагноза хронического эндометрита. Других способов верификации диагноза на сегодняшний день не существует.

Данные литературы, касающиеся изменений параметров иммунитета при хронических воспалительных процессах эндометрия (эндометритах) малочисленны [4, 8].

Цель исследования: определение маркеров иммунокомпетентных клеток, подтверждающих воспаление в эндометрии и уточнение характера воспалительного процесса при сопоставлении показателей местного и системного иммунитета.

### Материалы и методы

Показатели системного и местного иммунитета были изучены в лаборатории морфологических исследований и НИЛ клеточного и гуморального иммунитета ВЦЭРМ МЧС России. Группу исследования составили 151 женщина (средний возраст 32 года) с нарушением репродуктивной функции (бесплодие первичное, вторичное, невынашивание беременности), с гистологическими критериями хронического эндометрита. Все женщины наблюдались в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, где перед выполнением инвазивных процедур (лапаро- и гистероскопий, гистеросальпингографий, биопсий эндометрия) они были обследованы на наличие скрытых инфекций урогенитального тракта с использованием бактериологического, культурального, иммунофлюорисцентного, иммуноферментного и серологического ме-

тодов исследования (в качестве биологического материала исследовались секрет влагалища и цервикального канала, а также образцы крови). Контрольную группу составили 10 женщин с нормальной морфологической структурой эндометрия, соответствующей пролиферативной (5) и секреторной (5) фазам менструального цикла без признаков воспаления.

**Местный иммунитет.** Показатели местного иммунитета — количество естественных киллерных клеток (CD56+ и CD16+), лимфоцитов экспрессирующих маркеры активации HLA-DR+, CD25+, изучали в ткани эндометрия (соскобах) иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител (фирмы «Novocastra», Великобритания) по описанной методике [7]. Полученные результаты оценивали количественно (в трех полях зрения при увеличении микроскопа-объектива  $\times 40$ ).

**Системный иммунитет.** С целью подтверждения воспалительного процесса и определения его характера были изучены параметры системного иммунитета у 50 женщин. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МедБиоСпектр, Москва). Спонтанную, индуцированную продукцию и содержание в сыворотке цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) для изучения фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерферона- $\alpha$  (ИНФ- $\alpha$ ), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и тест-системы «Цитокин» (Санкт-Петербург) для определения интерферон- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ). Циркулирующие иммунные комплексы высоко-, средне-, низкомолекулярные (ЦИКв, ЦИКс, ЦИКн) определяли осаждением ПЭГ 6000. Уровни иммуноглобулинов классов А, М, G изучали турбидиметрическим методом. Секреторный иммуноглобулин А определяли иммуноферментным методом, используя тест-системы «Полигност», Санкт-Петербург.

## Результаты исследования

По результатам бактериологического, культурального и серологического исследований в группе обследованных у 9 женщин диагностирован гепатит С, у 8 женщин выявлена хроническая герпетическая, у 14 микоплазменная, у 5 хламидийная, у 47 уреамикоплазменная инфекции. Всего инфицировано было 49% (71) женщин, выявление двух и более возбудителей отмечено у 66% из числа инфицированных. До

проведения иммунологического обследования все женщины были пролечены по поводу выявленных инфекций урогенитального тракта. При гистологическом исследовании соскобов эндометрия морфологическое подтверждение хронического эндометрита отмечено у 11,9% женщин, только лимфолейкоцитарная инфильтрация стромы эндометрия имела место у 54,6%, фиброз стромы выявлен у 34,5% обследованных.

При иммуногистохимическом исследовании эндометрия в контрольной группе количество клеток, экспрессирующих CD56+, CD16+ и HLA-DR+ было 0–5 в поле зрения.

Полученные результаты исследования местного иммунитета от 151 женщины позволили нам выделить 3 группы обследованных (таблица).

В первую группу были включены 64 женщины (42,7%), в эндометрии которых количество лимфоцитов, экспрессирующих CD56+ и HLA-DR+, не отличались от контрольной группы (от 5 до 10 в поле зрения и 0–5 в поле зрения соответственно), но было повышено количество клеток, экспрессирующих CD16+ — от 10 до 50 в поле зрения.

Вторую группу составили 40 (26,7%) женщин, в эндометрии которых количество лимфоцитов, экспрессирующих CD56+ — было 10–25–30 в поле зрения, CD16+ — от 30 в поле зрения, HLA-DR+ — 15–20 в поле зрения, что превышало эти показатели по сравнению с контрольной группой почти в три раза.

Третью группу составили 47 (31,3%) женщин, в эндометрии которых количество клеток, несущих антигены CD56+, CD16+ и HLA-DR+ было выше 50 в поле зрения, что значительно превышало количество этих же показателей по сравнению с контрольной группой в 5 раз и выше.

При сопоставлении данных местного иммунитета с системным у женщин в различных группах было выявлено, что субпопуляционный состав лимфоцитов (рис. 1) в каждой из выделенных групп и у всех обследованных женщин достоверно не отличался от средних показателей нормы ( $p > 0,05$ ). У всех женщин и в каждой из

Таблица

Распределение женщин по группам в зависимости от количества лимфоцитов, экспрессирующих CD56+ в эндометрии

Группы (кол-во женщин)	Параметры местного иммунитета (в поле зрения)			
	CD56+	CD16+	HLA-DR	CD25+
1(64)	0–5–10	20–50	0–10	0
2(40)	10–25	30–50	10–30	0
3 (47)	От 30	От 50	От 30	0
Контроль(10)	0–5–10	0–5–10	0–5–10	0

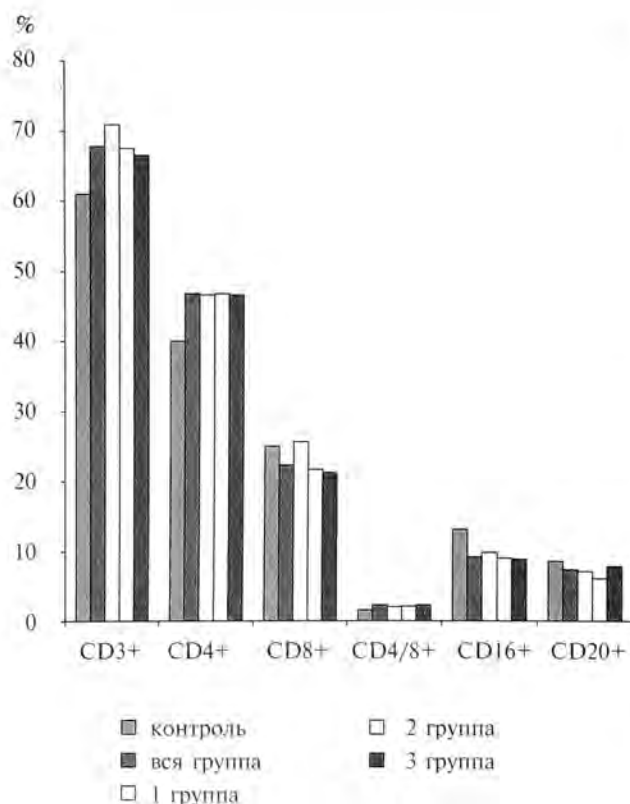


Рис. 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у женщин в зависимости от количества в эндометрии лимфоцитов, экспрессирующих CD56+

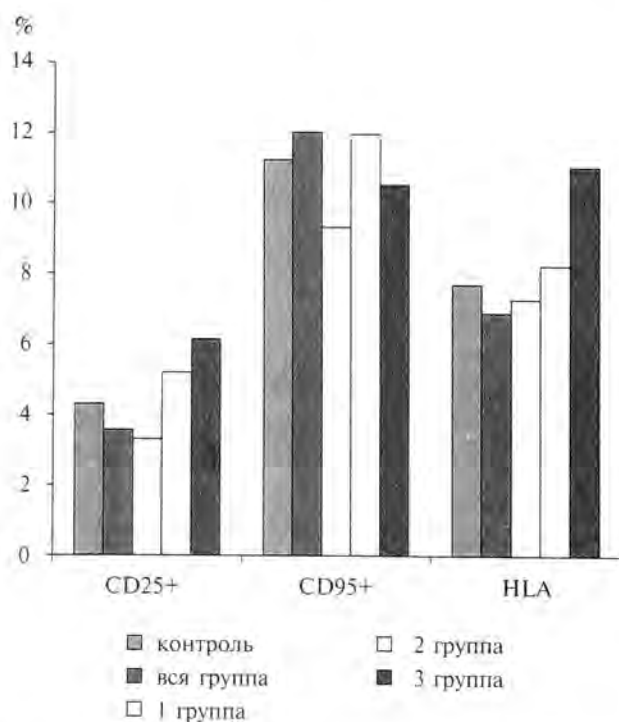


Рис. 2. Количество лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих маркеры активации (CD25+, CD95+, HLA(II)) у женщин в зависимости от количества в эндометрии лимфоцитов, экспрессирующих CD56+

выделенных групп отмечалась тенденция к снижению специфических цитотоксических лимфоцитов (CD8+) в периферической крови с наиболее выраженными изменениями в 3 группе. За счет этого несколько был увеличен иммунорегуляторный индекс, достигающий максимальных показателей в 3 группе. Содержание естественных киллеров (CD16+) в периферической крови приближалось к нижним границам нормы и в 3 группе этот показатель был самым низким.

Количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации CD95+ и HLA-DR+ (табл. 3), свидетельствующие об активности процесса, не отличались от средних показателей в контрольной группе. Количество лимфоцитов, экспрессирующих CD25+ (рис. 2) — маркер клеток-супрессоров пролиферации аутореактивных клеток, был снижен в 1 и во 2 группе [10]. Во всех группах отмечены высокие показатели спонтанной продукции ИЛ-2, при этом индуцированная продукция ростового фактора была в норме (рис. 3).

Показатели иммуноглобулинов классов А, М, G (рис. 4) были в норме, однако уровень секреторного иммуноглобулина А (sIgA) был повышен во всех исследуемых группах, что объясняется наличием воспалительного процесса в слизистой эндометрия и особенностями иммунитета слизистых. Отмечалось повышенное содержание ЦИКн во всех исследованных группах по сравнению с контрольной (рис. 5).

Спонтанная продукция и содержание в сыворотке ИФН-γ в целом и в выделенных группах статистически достоверно превышали значения этого показателя в контрольной группе, при этом

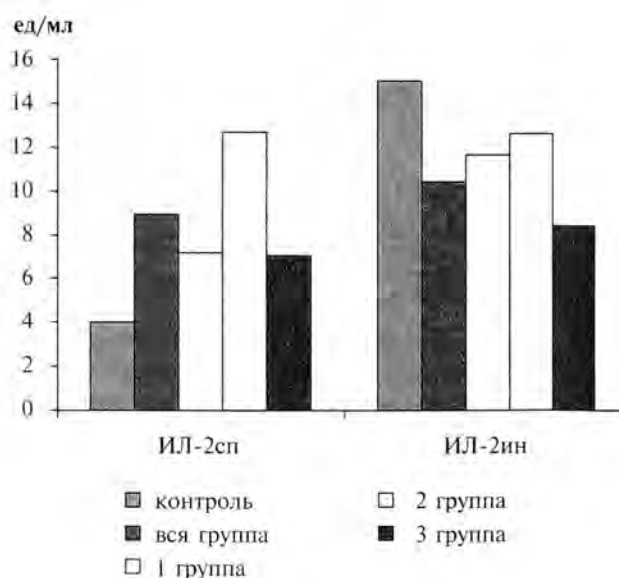


Рис. 3. Продукция ростового фактора ИЛ-2 у женщин в зависимости от количества в эндометрии лимфоцитов, экспрессирующих CD56+

максимальное содержание этого цитокина отмечалось у пациентов 3 группы (рис. 6) (тест Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ). Спонтанная продукция и содержание в сыворотке провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  у всех обследованных женщин, особенно во 2 и 3 исследуемых группах, превышало контрольные значения с максимальным нарастанием показателей в 3 группе (рис. 6), отличия между группами были достоверными (тест Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ). Спонтанная продукция и содержание в сыворотке ИЛ-4 были повышены у всех женщин (рис. 6), достоверно отличались от показателей контрольной группы и характеризовались максимальным увеличением в 3 группе (тест Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

На сегодняшний день большая роль в естественной иммунной защите эндометрия отводится большим гранулярным лимфоцитам, точнее натуральным киллерным клеткам с высокой экспрессией (CD16+CD56+++), способным лизировать широкий спектр клеток-мишеней. Именно эти клетки считаются основными регуляторами физиологических процессов, связанных с пролиферацией, и рассматриваются как иммунокомпетентные клетки, отвечающие за репродуктивный иммунитет и поддержание беременности [9,12].

В связи с тем, что формирование групп сравнения основывалось на результатах иммуногистохимического определения в соскобах эндометрия количества лимфоцитов, экспрессирующих CD56+, CD16+ и HLA-II параметры системного иммунитета были выборочно изучены у женщин в каждой из этих групп. Выявленное увеличение в эндометрии количества лимфоцитов, экспрессирующих CD56+ у пациентов второй и третьей групп, сочеталось с более низкими значениями в этих группах количества лимфоцитов периферической крови, осуществляющих цитотоксическую функцию, как специфическую (CD8+), так и неспецифическую (CD16+) и сопровождалось увеличением иммунорегуляторного индекса. Снижение этих субпопуляций лимфоцитов (CD8+, CD16+) в периферической крови можно объяснить миграцией этих клеток в очаг воспаления — эндометрий. Все обследованные группы характеризовались высокой спонтанной продукцией ростового фактора — интерлейкина-2, необходимого не только для пролиферации Т-, В-лимфоцитов, но и естественных киллерных клеток, что наряду с высокой спонтанной продукцией провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$  и высоким уровнем этих цитокинов в сыворотке подтверждает

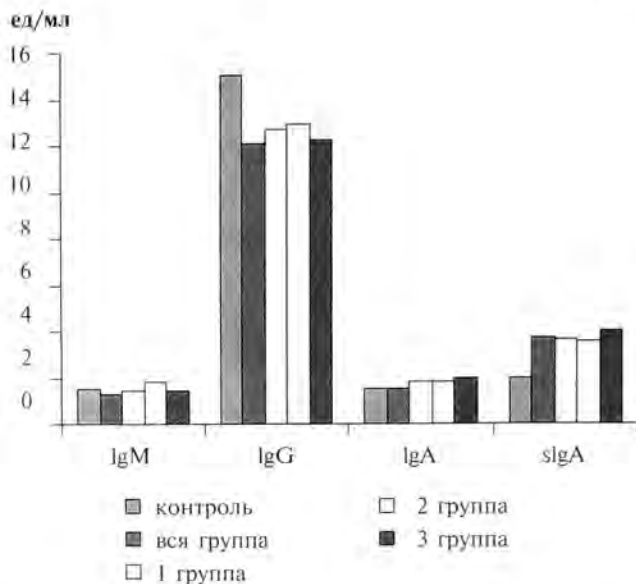


Рис. 4. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови (IgA, IgM, IgG, sIgA) и циркулирующих иммунных комплексов в крови у женщин в зависимости от количества в эндометрии лимфоцитов, экспрессирующих CD56+

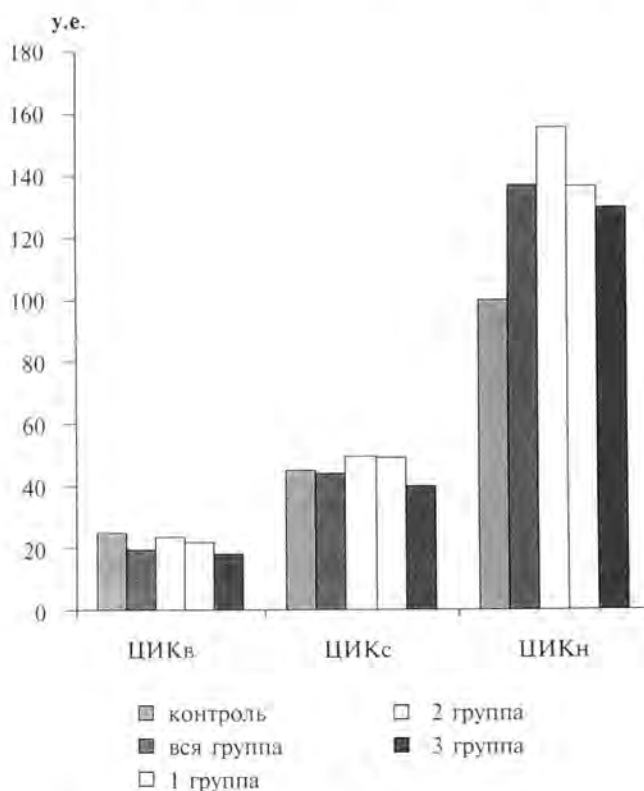


Рис. 5. Изменения циркулирующих иммунных комплексов

наличие воспалительного процесса во всех исследуемых группах. ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$  влияют на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток эндометрия, реализующих ее по Fas-зависимому или перфоринопосредованному

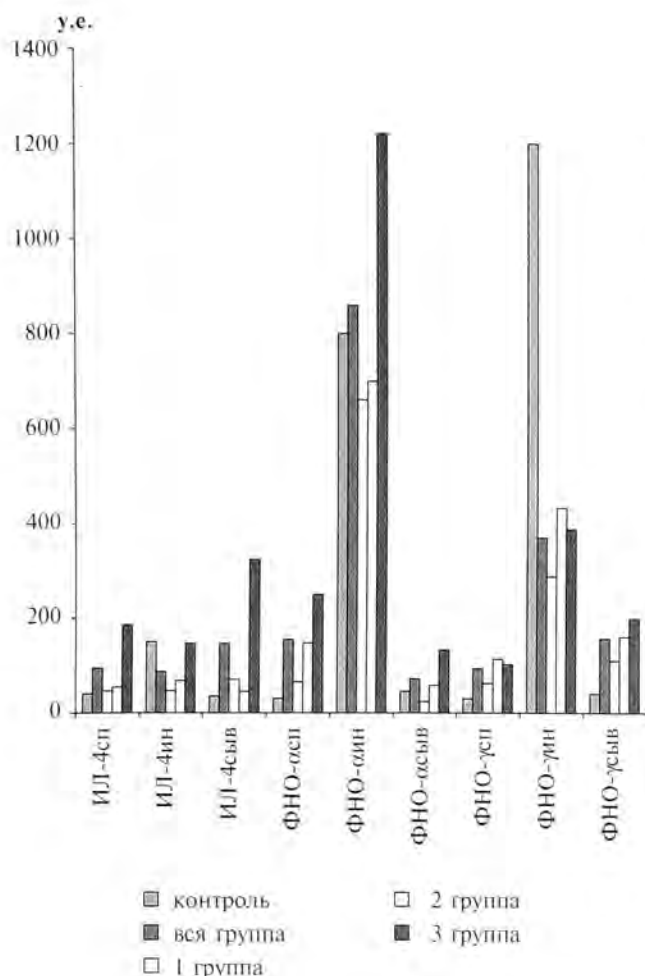


Рис. 6. Продукция цитокинов Тх1(ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ ) и Тх2(ИЛ-4) у женщин в зависимости от количества в эндометрии лимфоцитов, экспрессирующих CD56+

пути. Увеличенная продукция исследованных цитокинов может явиться одной из причин нарушения развития эмбриона и прерывания беременности.

По некоторым данным [11] на цитотоксическую функцию эндометриальных лимфоцитов также оказывает влияние ИЛ-4, высокое содержание в сыворотке и повышенная спонтанная продукция которого наблюдались во всех исследуемых группах. Повышенная спонтанная продукция ИЛ-4 и его высокий уровень в сыворотке отражает также активность гуморального иммунного ответа, что подтверждается повышенным уровнем секреторного иммуноглобулина А. Высокое содержание ЦИКн, характеризующихся тропностью к эндотелию, свидетельствует о возможном вовлечении в воспалительный процесс мелких сосудов и капилляров и способствует выраженности остроты процесса. Выявленные нарушения показателей местного (повышенное количество лимфоцитов, экспрессирующих

CD56+++CD16++) и системного иммунитета (снижение CD8+, CD16+, повышение иммунорегуляторного индекса, увеличенное содержание в сыворотке ЦИКн, высокая продукция ИЛ-2, ФНО- $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$ ) у пациенток 3 группы были расценены нами как аутоиммунное воспаление. Проведенное комплексное исследование параметров местного и системного иммунитета у женщин с нарушением репродуктивной функции позволило уточнить иммунопатогенез хронических эндометритов, подтвердить его при сомнительном гистологическом диагнозе (наличие только лимфолейкоцитарной инфильтрации или фиброзе строме) и выявить группу пациенток с аутоиммунным характером воспаления. Уточнение иммунопатогенеза хронических эндометритов позволяет обосновать и применять в дальнейшем иммунокорректирующую терапию.

#### Литература

1. Демидова Е.М. Привычный выкидыш (Патогенез, акушерская тактика) Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — 1993. — 42 с.
2. Кетинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. — СПб.: Гиппократ, 1998. — 156 с.
3. Кузнецова А.В. Хронический эндометрит // Архив патологии. — 2000. — № 3. — С. 48-52.
4. Кузнецова А.В., Пауков С.В., Воложук И.Н., Демидова Е.М., Казарян С.М. Морфологические особенности хронического эндометрита // Архив патологии. — 2001. — № 5. — С. 8-13.
5. Сметник В.П., Тумилович Л.Г. Неоперативная гинекология. 2-е изд. — СПб., 1995. — Кн. 2. — С. 46-52.
6. Хмельницкий О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. — СПб.: Сотис, 1994. — С. 136-144.
7. Эллиниди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия (методические рекомендации). — СПб., 2002. — С. 1-36.
8. Эллиниди В.Н., Калинина Н.М. Иммуноморфология эндометрия. Лечение бесплодия: нерешенные проблемы. — Саратов, 2001. — С. 158-162.
9. Cooper M., Fehniger T., Turner S., et al. Human natural killer cells a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. Blood. — 2001. — Vol. 97. — N 10. — P. 3146-3151.
10. Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N. et al. Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+ CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance 1. Journal of Immunology. — 1999. — Vol. 162. — P. 5317-5326.
11. Joyce S. Natural T cells Cranking up the immune system by prompt cytokine secretion. PNAS. — 2000. — Vol. 97. — N 13. — P. 6933-6935.
12. Chau H., Kim A., Hedrick C. et al. Endogenous natural killer enhancing factor-B increases cellular resistance to oxidative stresses. Free Radical Biology Medicine. — 1997. — Vol. 22. — N 3. — P. 497-507.

MODERN OPPORTUNITIES FOR DIAGNOSTICS OF CHRONIC ENDOMETRITIS

Ellinidi V.N., Davydova N.I., Kalinina N.M., Mikhina E.A., Dobrotvortseva O.A.