



**В. И. Кулаков, Н. И. Волков,
Ж. В. Беспалова**

Научный Центр акушерства,
гинекологии и перинатологии РАМН,
Москва

ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ В ЭНДОМЕТРИИ ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ И НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

■ В статье сообщается о результатах иммуногистохимического исследования эндометрия пациенток с бесплодием и наружным генитальным эндометриозом. Проведен анализ динамики распределения иммунокомпетентных клеток в эндометрии пациенток с бесплодием, обусловленным наружным генитальным эндометриозом в сравнении с пациентками, страдающими бесплодием трубно-перитонеального генеза.

Ключевые слова: эндометриоз, бесплодие, динамика CD3-CD4-CD8-лимфоцитов на протяжении менструального цикла, эндометрий

Введение

В литературе неоднократно предпринимались попытки объяснить механизмы бесплодия при наружном генитальном эндометриозе [2,5,6,9]. Результаты этих исследований позволяют предполагать, что иммунная система может играть существенную роль в патогенезе бесплодия при этом заболевании [5,6]. Однако вплоть до настоящего времени роль иммунной системы в патогенезе бесплодия, связанного с эндометриозом, изучена не до конца.

Как показали исследования последних лет, эндометрий играет фундаментальную роль в процессах имплантации [1]. Для успешной имплантации необходимо наличие эндометрия, готового принять функционально полноценный эмбрион на стадии бластоцисты и нормальное взаимодействие антигенов материнской и эмбриональной ткани. Регуляция взаимодействия между клетками эндометрия и трофобласта осуществляется с участием интерлейкина-1, интерлейкина-8, лептина и других звеньев иммунной системы [11].

По мнению ряда авторов, изменение состава и количества иммунокомпетентных клеток может приводить к нарушению процессов имплантации эмбриона в эндометрий [1,7]. Однако имеющиеся данные неоднозначны, что делает актуальным проведение исследования состояния иммунокомпетентных клеток эндометрия на протяжении менструального цикла у женщин с бесплодием и наружным генитальным эндометриозом.

Материал и методы исследования

В исследование включено 300 пациенток с регулярным 28-дневным овуляторным менструальным циклом, страдающих бесплодием. Всем была выполнена лапароскопия и биопсия эндометрия. В соответствии с задачами исследования, все пациентки были разделены на 2 группы.

Основную группу составили 150 пациенток с бесплодием и наружным генитальным эндометриозом I-IV степени распространения (согласно пересмотренной классификации Американского общества фертильности, г-AFS, 1996) [13] при проходных маточных трубах.

Во II группу (контрольную) вошли 150 пациенток, страдающих бесплодием, обусловленным спаечным процессом в малом тазу (при непроходимых маточных трубах).

Средний возраст пациенток $31,1 \pm 3,2$ лет (при колебаниях от 18 до 42 лет). Продолжительность периода бесплодия $4,6 \pm 1,9$ лет (при колебаниях от 1 до 15 лет).

Таблица

Используемые моноклональные антитела

Название	Предназначено (CD)	Специфичность в отношении антигенов	Распределение маркированных антигенов	Разведение
Anti-Leu4	CD3	Молекулярный вес (МВ) 22–28 кД. Поверхностные антигены	T-лимфоциты. Пан-T-маркер	1:200
Anti-Leu3a	CD4	МВ 55 кД. Поверхностные антигены	T4-хелперы/индукторы (моноциты, макрофаги)	1:400
Anti-Leu2a	CD8	МВ 32 кД. МВ 43 кД. Поверхностные антигены	T8-цитотоксические/супрессорные лимфоциты	1:400
Anti-Leu7 (HNK-1)	—	МВ 110 кД	Натуральные киллеры (НК); Подгруппа T-лимфоцитов	1:50
Anti-Human B-cell Клон To 15	CD22	МВ 130 кД	B-лимфоциты. Пан-B-маркер	1:100

Лапароскопия и биопсия эндометрия была проведена с 5 по 28 день менструального цикла. В каждый из дней указанного периода оперировано 5–7 пациенток. Полученные образцы ткани эндометрия сохраняли при температуре -800°C до микроскопического исследования.

Соответствие каждого образца эндометрия определенному дню менструального цикла устанавливали с помощью вычисления относительно даты первого дня последней менструации и гистологического исследования биоптатов эндометрия по методу Dallenbach-Hellwer (1981) [2].

Для проведения иммунохимического исследования были приготовлены микропрепараты образцов эндометрия. Идентификация CD3-, CD4- и CD8-позитивных лимфоцитов, натуральных киллеров и В-лимфоцитов была проведена с использованием панели из 5 моноклональных антител: Anti-Leu4, Anti-Leu3a, Anti-Leu2a, Anti-Leu7, Anti-Human-B-cell (таблица). Эти антитела, специфически связываясь с лимфоидными клетками, окрашивают их в коричневый цвет, что позволяет отличить их при световой микроскопии.

Анализ и оценка препаратов осуществлялись с помощью световой микроскопии. В каждом срезе проводили подсчет абсолютного числа клеток, меченных соответствующими антителами.

Статистический анализ результатов проводился с применением критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Динамика распределения иммунокомпетентных клеток в эндометрии в течение менструального цикла.

1. Распределение T-лимфоцитов

1.1. CD3-позитивные T-лимфоциты

CD3-антиген содержится на мембранах T-лимфоцитов и позволяет определить их количество

среди всех лимфоцитов. У пациенток с эндометриозом начальный уровень CD3-позитивных T-клеток составлял 240 в 1 мм^2 на 5-й день цикла, достигал 290 в 1 мм^2 к 7 дню цикла ($p>0,05$) и снижался до 180 в 1 мм^2 к 12 дню цикла, далее варьируясь в пределах 100–150 клеток в 1 мм^2 до конца цикла.

В контрольной группе число CD3-позитивных T-лимфоцитов в ранней пролиферативной фазе колебалось с 420 клеток в 1 мм^2 на 5-й день менструального цикла до 570 в 1 мм^2 на 6-й день ($p>0,05$). После 6 дня цикла их количество снижалось до 180 в 1 мм^2 к 12 дню. Далее число CD3-позитивных T-лимфоцитов варьировалось в пределах 100–150 клеток в 1 мм^2 .

Сравнение динамики изменения уровня CD3-позитивных T-лимфоцитов у женщин с эндометриозом и в контрольной группе не выявило существенных различий на протяжении менструального цикла ($p>0,05$).

1.2. T-лимфоциты хелперы/индукторы (CD 4)

T-лимфоциты хелперы/индукторы (CD4-позитивные T-лимфоциты), участвуют в начальном этапе иммунного ответа. Они распознают чужеродные антигены и передают информацию о них В-лимфоцитам, которые, в свою очередь, вырабатывают специфические антитела.

У пациенток с эндометриозом число CD4-позитивных T-лимфоцитов было максимальным между 5 и 6 днем менструального цикла и составляло 110–120 в 1 мм^2 . Далее к 13-му дню менструального цикла их количество стремительно снижалось до 30 клеток в 1 мм^2 . После незначительного повышения на 16-й день, происходило медленное снижение до 20 клеток в 1 мм^2 , вплоть до конца менструального цикла.

В контрольной группе на протяжении всего менструального цикла динамика изменения уровня CD4-позитивных лимфоцитов соответ-

ствовала изменениям в группе больных эндометриозом ($p > 0,05$).

1.3. Т-супрессоры/цитотоксические лимфоциты (CD8)

Т-супрессоры/цитотоксические лимфоциты (CD8-позитивные лимфоциты) играют противоположную Т-хелперам функцию в гуморальном иммунитете (угнетают систему гуморального иммунитета). Они принимают участие в формировании естественной или индуцированной антигеном иммунологической толерантности. Важная роль принадлежит этим клеткам в процессах угнетения естественного иммунного ответа на индукцию оплодотворенной яйцеклетки, которая на начальном этапе воспринимается иммунной системой как чужеродный антигенный объект. При нарушении функции Т-супрессорного звена иммунитета в подавляющем большинстве случаев происходит отторжение эмбриона на самых ранних этапах имплантации.

Максимальный уровень CD8-позитивных Т-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом был на 5-8-й день менструального цикла и составлял 125 клеток в 1 мм^2 . Начиная с 9-го дня их число быстро снижалось, достигая уровня 48 клеток в 1 мм^2 к 14-му дню менструального цикла. После 14-го дня их количество было относительно постоянным вплоть до конца менструального цикла ($p > 0,05$).

В контрольной группе изменение количества CD8-позитивных лимфоцитов в 1 мм^2 соответствовало характеру изменений в группе больных эндометриозом. Различия были статистически недостоверны ($p > 0,05$).

1.4. Натуральные киллеры (Leu7)

Натуральные киллеры (Leu7-позитивные клетки) — большие гранулярные клетки, содержащие белок перфорин, который, проникая в цитоплазму клетки-мишени, вызывает осмотический взрыв и лизис. Натуральные киллеры осуществляют важную функцию иммунной системы — сохранение генетического гомеостаза организма путем киллинга клеток, несущих генетическую неоднородность.

У пациенток с эндометриозом число Leu7-позитивных клеток было постоянным на протяжении всего менструального цикла (около 4 в 1 мм^2).

В контрольной группе Leu7-позитивные клетки на протяжении всего менструального цикла встречались редко, были слабо окрашены и не имели четкой локализации. Эти клетки располагались в строме эндометрия и среди скопленных лимфоцитов, а в некоторых препаратах отсутствовали. Максимальное число этих клеток (20 в 1 мм^2) зафиксировано на 5-й день менструального цикла. На 8-й день их количество сни-

жалось до 3–4 в 1 мм^2 , оставаясь стабильным на протяжении всех последующих дней менструального цикла.

Статистически достоверных отличий от контрольной группы не выявлено ($p > 0,05$).

2. Распределение В-лимфоцитов (CD22)

В-лимфоциты отвечают на антигенное раздражение синтезом антител, связывающих эти антигены. Конечной фазой этой реакции является уничтожение чужеродных антигенов.

Этот класс лимфоцитов был обнаружен в скоплениях лимфоцитов. Подобная микроскопическая картина наблюдалась в обеих группах обследованных.

В эндометрии пациенток, страдающих эндометриозом, максимальный уровень CD22-позитивных клеток зарегистрирован на 5-8-й день менструального цикла (40 клеток в 1 мм^2). К концу пролиферативной фазы, на 11-й день менструального цикла, количество этих клеток снижалось до 20 в 1 мм^2 , впоследствии их число колебалось от 10 до 25 клеток в 1 мм^2 с пиковым значением на 13-й день менструального цикла.

Количественная динамика CD22-позитивных В-лимфоцитов у пациенток со спаечным процессом в малом тазу: на 6–8-й день менструального цикла достигался максимум со средним числом 50 клеток в мм^2 . После 9-го дня менструального цикла их число стремительно снижалось и между 11 и 23 днями составляло 12 CD22-позитивных клеток в 1 мм^2 . Между 23 и 26 днями их число возрастало до 30 в 1 мм^2 , затем снова снижалось к концу менструального цикла.

В обеих обследованных группах пациенток существенных различий не отмечалось ($p > 0,05$).

3. Распределение макрофагов

Макрофаги выполняют функцию разрушения и переваривания поврежденных, дефектных, состарившихся клеток организма, а также чужеродных клеточных агентов.

Встречаемость и распределение макрофагов в эндометрии на протяжении менструального цикла были одинаковыми у пациенток обеих групп. Количественные изменения клеток были незначительны ($p > 0,05$).

В начале менструального цикла среднее число макрофагов варьировалось в пределах 150–200 клеток в 1 мм^2 , затем к 11-му дню менструального цикла медленно снижалось до 100 ± 10 клеток. С 11-го по 21-й день количество макрофагов оставалось стабильным, а начиная с 22-го дня менструального цикла, их число возрастало, достигая уровня фазы ранней пролиферации.

4. Агрегации лимфоцитов

Агрегации лимфоцитов встречались на протяжении всего менструального цикла в эндомет-

рии пациенток обеих групп. В группе пациенток с эндометриозом агрегация лимфоцитов наблюдалась в фолликулярную фазу в 27% образцов и в 6% образцов в лютеиновую фазу. В контрольной группе агрегация лимфоцитов наблюдалась в 22% образцов в фолликулярную фазу цикла и в 10% образцов в лютеиновую фазу цикла. Не было различий структуры скоплений лимфоцитов у пациенток обеих обследованных групп. Скопления лимфоцитов состояли из сотен клеток, расположенных в основном в функциональном слое. Небольшие группы лимфоцитов присутствовали вокруг желез.

Центральные поля крупных скоплений состояли преимущественно из В-лимфоцитов. Т-лимфоциты локализовались в основном в краевых зонах этих полей.

Макрофаги были представлены по краям, и лишь изредка — внутри скоплений лимфоцитов.

Обсуждение

1. Т-лимфоциты. Различные подгруппы Т-лимфоцитов обнаруживались как в виде отдельных клеток, так и в виде интра- и субэпителиальных клеточных агрегатов в эндометрии в течение всего менструального цикла. Количество и распределение этих клеток в течение менструального цикла не различаются у пациенток с эндометриозом и пациенток контрольной группы.

Наибольшее количество клеток было обнаружено с помощью маркера anti-Leu 4 (CD3). Установлено, что динамика распределения клеток различных подгрупп схожа и имеет 2 максимума: в раннюю пролиферативную фазу и в конце секреторной фазы, без выраженных изменений в промежутке. Среднее количество различных Т-лимфоцитов имело колебания, не превышающее ± 10 клеток в 1 мм^2 во вторую фазу цикла. При этом высокая концентрация Т-лимфоцитов в начале менструального цикла может быть объяснена анатомическими особенностями: толщина функционального слоя эндометрия в эту фазу составляет от 0,5 до 4 мм. Следовательно, в начале пролиферативной фазы менструального цикла биопсия может быть взята из более глубоких слоев эндометрия с наибольшей плотностью клеток.

Соотношение CD4:CD8 — «индекс иммунорегуляции» — является показателем гармоничного функционирования иммунной системы и в норме составляет 1:2. В раннюю пролиферативную фазу соотношение CD4:CD8 составило 1:1. В дальнейшем количество CD4-позитивных клеток снижалось, в то время как уровень CD8-позитивных клеток оставался относительно стабильным. К концу менструального цик-

ла мы наблюдали преобладание CD8-позитивных Т-лимфоцитов, при этом соотношение CD4:CD8 колебалось от 1:2 до 1:4. Подобная картина наблюдалась в эндометрии больных обеих групп.

Полученные данные совпадают с результатами проведенных ранее исследований [5, 14]. Преобладание CD8-позитивных Т-лимфоцитов в тканях, чувствительных к эстрогенам, может быть объяснено тем, что эти клетки имеют рецепторы эстрогенов, тогда как у CD4-позитивных лимфоцитов эти рецепторы отсутствуют [12].

2. Натуральные киллеры в небольшом количестве присутствовали в эндометрии в течение всего менструального цикла. Мы не обнаружили разницы в количестве и распределении этих клеток у женщин с эндометриозом по сравнению с контрольной группой. Lydyard и Grossi в работе по изучению иммунологических возможностей натуральных киллеров доказали присутствие небольшого количества этих клеток в эндометрии. Кроме того, их количество подвергалось циклическим изменениям [8]. Аналогичные результаты относительно эндометрия здоровых женщин были описаны Kamat и Isaacson (1987), King et al. (1988) [5, 6].

3. В-лимфоциты. В эндометрии обследованных пациенток найдено небольшое количество В-лимфоцитов. В некоторых скоплениях лимфоцитов обнаружены поля, состоящие исключительно из В-лимфоцитов. Эти находки совпадают с результатами исследований эндометрия здоровых женщин [5, 10].

4. Макрофаги. Макрофаги присутствовали в эндометрии женщин с эндометриозом и в контрольной группе в сходных количествах на протяжении всего менструального цикла. Средний уровень макрофагов был высоким в начале и в конце менструального цикла, а в середине цикла имел тенденцию к снижению. Макрофаги были равномерно распределены в строме эндометрия, и лишь изредка встречались интра- и субэпителиально. Однако роль макрофагов эндометрия при эндометриозе и связанном с ним бесплодии остается неясной. В настоящее время некоторые исследователи сообщают о повышении уровня и активности макрофагов в перитонеальной жидкости у пациенток с эндометриозом [3, 4, 9, 15]. Другие авторы указывают на повышение количества макрофагов в секреторную фазу [8].

5. Скопления лимфоцитов. В эндометрии пациенток обеих групп обнаруживались скопления лимфоцитов на протяжении всего менструального цикла. Выявлена циклическая зависимость в распределении этих скоплений.

В контрольной группе они были обнаружены в 22% образцов материала в пролиферативную фазу и в 10% образцов в секреторную фазу. В группе пациенток с эндометриозом скопления лимфоцитов обнаруживались в 27 и 6% образцов материала соответственно. Скопления лимфоцитов располагались главным образом в нижней части функционального и базального слое эндометрия и состояли из В-лимфоцитов в центральной зоне и Т-лимфоцитов по периферии скоплений. Подобные данные относительно распределения и состава скоплений лимфоцитов имеются в литературе, однако эти исследования базируются на малом числе наблюдений, и в них отсутствует подбор пациенток по возрасту [5, 10, 14].

Заключение

Анализируя данные, полученные при изучении динамики распределения иммунокомпетентных клеток в эндометрии пациенток с эндометриозом и со спаечным процессом в малом тазу на протяжении менструального цикла, можно сделать следующие выводы:

1. Количество и распределение Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, скоплений лимфоцитов подвержены циклическим изменениям, что, по нашему мнению, может свидетельствовать о тесной взаимосвязи функции яичников и локальной функции иммунокомпетентных клеток, и подтверждает характеристику эндометрия как слизисто-лимфатической ткани.

2. Отсутствие различий в количественных и качественных показателях динамики распределения иммунокомпетентных клеток эндометрия (различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, макрофагов) в зависимости от фаз менструального цикла у женщин с бесплодием при наружном генитальном эндометриозе в сравнении с контрольной группой (бесплодие при непроходимых маточных трубах вследствие спаечного процесса развившегося после перенесенных

воспалительных заболеваний органов малого таза) свидетельствует о сохранении нормальной функции эндометрия у пациенток с бесплодием при наружном генитальном эндометриозе.

Литература

1. Carver H., Martin K., Stryopoulou I., Barlow D., Sargen I., Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst // *Human Reproduction*. — Vol. 18, N 2. — 2003. — P. 283-290.
2. Dallenbach-Hellweg G. Histopatologie des endometriums. - Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1981.
3. Haney A.F., Handwerger S., Weiberg G.B. Peritoneal fluid prolactin in infertile women with endometriosis: lack of evidence of secretory activity by endometrial implants // *Fertil. Steril.* — 1984. — Vol. 42. — P. 932-938.
4. Halme J., Hammond M.G., Hulka J.F. et al. Retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis // *Obstetr. Gynecol.* — 1984. — 64: 151-154.
5. Kamat B.R., Isaacson P.G. The immunohistochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium // *Am. J. Pathol.* — 1987. — Vol. 127. — P. 66-73.
6. King A., Wellings V., Gardner L., Loke Y.W. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle // *Hum. Immunol.* — 1988. — Vol. 24. — P. 195-205.
7. Klentzeris L.D. Роль эндометрия в имплантации (обзор литературы). // *Проблемы репродукции*. — N 2. — 1999.
8. Lyggyard P., Grossi C. Cells involved in the immune response. In: *Immunology*. — Edinburgh, London, Melbourne, 1989. — P. 2.2-2.17.
9. Meitler L. Immunphenotyp von Endometrium und Endometriose // *Endometriose*. — 1989. — N 3. — P. 64-69.
10. Morris H., Edwards J., Tiltman A., Emms M. Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study // *J. Clin. Pathol.* — 1985. — Vol. 38. — P. 644-652.
11. Pellicer A., Dominguez F., Simon C. Endometrial factors of implantation failure. In: *Joint SIG Embryology and SIG Reproductive Genetics course. ESHRE 2003*. — Madrid, 2003. — P. 30-32.
12. Press M.F., Moussec-Goebel N.A., Bur M., Green G.L. Estrogen receptor localization in female genital tract // *Am. J. Pathol.* — 1989. — Vol. 123. — P. 280-292.
13. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. // *Fertil. Steril.* — 1997. — Vol. 67, N 5. — P. 817-821.
14. Tabibzadeh S.S. Proliferative activity of lymphoid cells in human endometrium throughout of menstrual cycle // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1990. — Vol. 70. — P. 437-443.
15. Weinberg J.B., Haney A.F., Ramakrishnan S. Peritoneal fluid and plasma level of human macrophage colony - stimulation factor in relation to peritoneal fluid macrophage content // *Blood*. — 1991. — 78. — P. 513-516.