

# Хронический эндометрит. Подходы к диагностике и терапии

Н.М. Калинина<sup>✉</sup>

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России. 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2

Одной из причин нарушения репродуктивной функции является хронический активный эндометрит. Данные гистологического исследования биоптатов эндометрия позволяют поставить диагноз «хронический эндометрит» (ХЭ), оценить активность процесса. Иммуногистохимическое исследование биоптатов позволяет уточнить характер иммунологических нарушений при ХЭ и выделить группу пациенток с аутоиммунным воспалением и аутоиммунным ответом в эндометрии (аутоиммунным эндометритом). Исследование в периферической крови популяций натуральных киллеров, В1- и В2-клеток, В-клеток памяти, изучение цитотоксической активности клеток с киллерным потенциалом позволяют мониторировать результаты проводимой иммуноотропной терапии без применения на этом этапе повторных биопсий эндометрия.

Результаты, представленные в статье, подтверждают эффективность использования Полиоксидония в терапии ХЭ и восстановлении репродуктивной функции.

**Ключевые слова:** хронический эндометрит, биопсия, иммуногистохимия, нарушение репродуктивной функции, проточная цитометрия, иммуноотропная терапия, Полиоксидоний

<sup>✉</sup>doctkalin@mail.ru

**Для цитирования:** Калинина Н.М. Хронический эндометрит. Подходы к диагностике и терапии. Consilium Medicum. 2015; 17 (6):

## Chronic endometritis. Approaches to diagnosis and treatment

N.M.Kalinina<sup>✉</sup>

The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine. 194044, Russian Federation, Saint Petersburg, ul. Akademika Lebedeva, d. 4/2

Chronical endometritis (CE) is responsible for women infertility. Investigation of histological data of endometrial target biopsy permit to diagnose the CE and elicit activity of inflammation immunohistochemical study of biopsy permit to define more exactly nature of CE, specify local immunological disturbances, distinguish the patients with autoimmune inflammation and local autoimmune answer. Subsets definition of natural killer (NK) cells, B1-, B2-cells, memory B-cells in the peripheral blood, NK, TNK, T-cells cytotoxicity study permit realize monitoring of immune therapy without repeated biopsy realization. Presented data confirm efficiency of Polyoxidonium (azoximer bromide) in therapy of CE and fertility reconstruction

**Key words:** chronical endometritis, biopsy, immunohistochemistry, infertility, flow cytometry immunotherapy, Polyoxidonium

<sup>✉</sup>doctkalin@mail.ru

**For citation:** Kalinina N.M. Chronic endometritis. Approaches to diagnosis and treatment. Consilium Medicum. 2015; 17 (6):

Диагноз «хронический эндометрит» (ХЭ) является прежде всего гистологическим диагнозом, который ставится морфологами при взятии биопсии эндометрия и характеризуется инфильтрацией стромы эндометрия мононуклеарными клетками.

Клинически ХЭ часто протекает бессимптомно и становится причиной нарушения репродуктивной функции. По данным разных авторов, ХЭ диагностируется у 12–46% пациенток с бесплодием, у 30% женщин с неудачами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и у 12% больных с привычным невынашиванием беременности [1–4].

Внедрение в лабораторную диагностику ХЭ метода иммуногистохимии с использованием разных по своей направленности моноклональных антител (CD16, CD56, CD20, CD138) позволило оценить активность иммунного воспаления, характер нарушений местного иммунитета эндометрия и более эффективно применять иммуноотропную терапию. В связи с этим целью настоящего исследования стало сравнение нарушений параметров местного иммунитета эндометрия и системного иммунитета в динамике до и после применения в схеме иммуноотропной терапии [5–7].

### Материалы и методы

В ходе многолетнего наблюдения за пациентками с ХЭ удалось выделить несколько типов отклонений в параметрах локального и системного иммунного ответа, сопровождающихся нарушением репродуктивной

функции. Для адекватной оценки обнаруживаемых нарушений была сформирована контрольная группа женщин детородного возраста, у которых при выяснении причин отсутствия беременностей ХЭ и другие гинекологические заболевания были исключены (n=24):

- 1-я группа – вошли 47 пациенток с хроническим активным эндометритом, нарушением репродуктивной функции, из них 22 были с повторными неудачными ЭКО (отсутствие имплантации эмбрионов), 7 женщин – с привычным невынашиванием беременности (прерывание возникало при сроках 5–6 нед) и 18 – с первичным бесплодием и на момент обследования без эпизодов ЭКО в анамнезе.
- 2-я группа – вошли 36 женщин с аутоиммунным эндометритом, нарушением репродуктивной функции и наличием аутоиммунного воспаления и аутоиммунного характера ответа, который был диагностирован в ходе иммунологического обследования.

Для исследования параметров местного иммунитета методом иммуногистохимии применялись моноклональные антитела фирмы «Новокастра» (Великобритания), направленность которых позволяла выявлять 2 популяции натуральных киллеров (NK): CD56<sup>bright</sup> и CD16<sup>bright</sup>, В-клетки (CD20) и плазматические клетки – CD138. Выбор моноклональных антител определялся в том числе появившимися публикациями, которые указывают на важную роль этих субпопуляций мононуклеаров в поддержании нарушений репродук-

тивной функции [1, 8]. Подсчет лимфоцитов осуществлялся в световом микроскопе при увеличении  $\times 400$  в трех полях зрения. Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Параметры системного иммунитета исследовались методом проточной цитометрии с применением «гейтирования» по CD45, двухпараметрических гистограмм и трехцветного анализа лимфоцитов соответствующими моноклональными антителами [5].

### Результаты и обсуждение

Результаты иммуногистохимического анализа параметров местного иммунитета эндометрия в контрольной группе на 22-й день цикла представлены в табл. 1. Результаты исследования показывают, что в эндометрии на 22-й день цикла при отсутствии эндометрита и других гинекологических заболеваний количество мононуклеаров, инфильтрирующих эндометрий, минимально [3, 9].

При параллельном исследовании в периферической крови (ПК) НК в контрольной группе было обнаружено (табл. 2), что на большей части НК экспрессированы как CD16-, так и CD56-рецепторы, т.е. функционально детерминированные НК составляют не более 7%.

Была также оценена функциональная (киллерная) активность изученных в ПК клеток.

При оценке в контрольной группе функциональной активности естественных НК методом проточной цитометрии было установлено (табл. 3), что при стимуляции количество клеток, экспрессирующих CD107a, возрастает более чем в 8 раз.

Представлялось важным с использованием метода проточной цитометрии оценить все субпопуляции В-лимфоцитов (общее количество В-клеток В1-, В2-субпопуляции, В1- и В2-клеток памяти) в контрольной группе. Данные изучения представлены в табл. 4.

Результаты, полученные в группе женщин без гинекологических и других хронических заболеваний, укладываются в референсные значения, приводимые другими авторами [4, 9–11].

Результаты сравнения параметров местного иммунитета эндометрия пациенток контрольной группы и аналогичных параметров у женщин с хроническим активным эндометритом (ХАЭ) представлены в табл. 5. Как видно из данных, представленных в табл. 5, нарушения параметров местного иммунитета в 1-й группе характеризовались достоверным повышением количества клеток, инфильтрирующих эндометрий с маркерами CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>bright</sup>. Учитывая, что CD56<sup>bright</sup>-лимфоциты ответственны за продукцию провоспалительных цитокинов, а CD16<sup>bright</sup>-лимфоциты обладают выраженным цитотоксическим (киллерным) потенциалом, можно предположить, что в случае наступления физиологической беременности или при переносе эмбриона в ходе ЭКО эти клетки в связи с различиями генотипов супругов по системе HLA и кодоминантным типам наследования определяют эмбрион наполовину «чужим». Эмбрион будет подвергаться иммунологической «атаке» обоих типов киллеров, которые, используя разные механизмы, будут способствовать прерыванию беременности [12, 13].

**Таблица 1. Показатели местного иммунитета эндометрия на 22-й день цикла в контрольной группе**

Показатели	CD56 <sup>bright</sup>	CD16 <sup>bright</sup>	CD20	CD138
Контрольная группа (n=24)	3,4±0,7	4,2±0,8	1,3±0,3	0

**Таблица 2. Распределение популяций НК в ПК женщин контрольной группы (n=24)**

CD56+CD16-	(CD56 <sup>bright</sup> )	2,52±0,6
CD56-CD16+	(CD16 <sup>bright</sup> )	4,28±0,9
CD56+CD16+		87,5±17,0

**Таблица 3. Определение цитотоксической активности естественных НК в контрольной группе (n=24) по экспрессии CD107a на НК-клетках (CD3-CD (16+56)+)**

Спонтанная экспрессия	2,06±0,9
Стимулированная экспрессия	17,27±1,4
Индекс стимуляции	8,7±1,3

**Таблица 4. Субпопуляции В-лимфоцитов в ПК в контрольной группе**

Субпопуляции В-лимфоцитов	Контрольная группа (n=24)
CD19, % от общего количества В-клеток)	10,8±1,6
CD19, кл/мкл	368±42
CD19+CD27+, % от общего количества В-клеток памяти	5,0±1,5
CD19+CD27+, кл/мкл	165±35
CD19+CD5+ % В1-аутореактивных В-лимфоцитов	2,8±0,3
CD19+ CD5+, кл/мкл	79±11
CD5+CD27+, % от В-лимфоцитов, аутореактивные В-лимфоциты	3,0±0,4
CD5+CD27+, кл/мкл	9,0±1,0

При параллельном исследовании параметров системного иммунитета в группе обследованных женщин с нарушением репродуктивной функции было установлено увеличение терминально дифференцированных натуральных киллеров, причем если отмечалась тенденция к увеличению CD56<sup>bright</sup>-клеток, то 4-кратное увеличение клеток с фенотипом CD16<sup>bright</sup>, обладающих выраженным киллерным потенциалом, было достоверным (табл. 6).

**Таблица 5. Результаты сравнения изученных показателей местного иммунитета эндометрия в норме и при ХАЭ, осложнившимся нарушением репродуктивной функции**

Показатели	CD56 <sup>bright</sup>	CD16 <sup>bright</sup>	CD20	CD138
Контрольная группа (n=24)	3,4±0,7	4,2±0,8	1,3±0,3	0
С ХАЭ (n=47)	18,1±3,6*	56,1±11,2*	3,3±2,1	0
p<0,05				

**Таблица 6. Количество лимфоцитов CD16+, CD56+ (CD3-CD19-) в ПК в норме и в группе с ХАЭ**

	Контроль (n=24)	Группа с ХАЭ (n=47)
CD56+CD16-(CD56 <sup>bright</sup> )	2,52±0,3	5,9±1,5
CD56-CD16+(CD16 <sup>bright</sup> )	4,28±0,5	16,7±2,7*
CD56+CD16+	87,5±7,0	77,4±10,3
p<0,05		

Цитотоксическая (киллерная) активность НК-клеток определяется по экспрессии на мембране маркера CD107a [14]. При исследовании методом проточной цитометрии спонтанной и индуцированной экспрессии CD107a (с применением клеток перевиваемой линии К-562) было выявлено достоверное повышение количества клеток, спонтанно экспрессирующих маркер CD107a в группе с ХАЭ, в связи с чем индекс стимуляции в группе лиц с ХАЭ был достоверно снижен (табл. 7).

При исследовании субпопуляций В-клеток в ПК – общей популяции В-клеток – CD19+, В-клеток памяти –CD19+CD27+, аутореактивных В-лимфоцитов –CD19+CD5+, аутореактивных В-клеток памяти –CD5+CD27+ достоверных отличий показателей в группе с ХАЭ от контрольной группы обнаружено не было.

Наличие системного иммунного воспаления, активации клеток ПК в группе женщин с ХАЭ подтверждалось достоверным повышением спонтанной продукции мононуклеарами ПК (МНПК) провоспалительных цитокинов (табл. 8).

Учитывая выявленные нарушения параметров местного и системного иммунитета у женщин с ХАЭ, в качестве препарата выбора для терапии этих нарушений назначался Полиоксидоний®. Как известно, Полиоксидоний® наряду с иммуномодулирующим действием обладает антиоксидантной активностью, стабилизирует мембраны клеток, уменьшает токсическое действие других лекарственных препаратов.

Терапия Полиоксидонием в дозе 12 мг в суппозиториях (ректально или вагинально) осуществлялась в течение месяца – 15 введений через день. Результатом

**Таблица 7. Определение цитотоксической активности естественных киллерных клеток в норме и при ХАЭ по экспрессии CD107a на НК-клетках (CD3-CD (16+56)+)**

	Контроль (n=24)	Группа с ХАЭ (n=47)
Спонтанная экспрессия	2,06±0,9	5,6±0,5*
Стимулированная экспрессия	17,27±1,4	12,9±1,7
Индекс стимуляции	8,7±1,3	2,6±0,3*
p<0,05		

**Таблица 8. Спонтанная продукция провоспалительных цитокинов МНПК у пациенток с ХАЭ в сравнении с контрольной группой**

Спонтанная продукция цитокинов МНПК, пг/мл	Контроль (n=24)	Группа с ХАЭ (n=47)
ИФН-γ	20±5	60±23
Ил-6	35±7	100±32
ФНО-α	33±12	125±30

**Таблица 9. Результаты иммуногистохимического исследования**

Показатели	CD56	CD16	CD20	CD138
Контрольная группа (n=24)	2,4±0,2	2,5±0,2	2,3±0,1	0
С АИЭ (n=36)	16,1±1,9*	23,1±3,2*	32,3±2,1*	8,5±1,5*
p<0,05				

**Таблица 10. Количество В-лимфоцитов, аутореактивных В-лимфоцитов, В-лимфоцитов памяти, аутореактивных В-лимфоцитов памяти в ПК в норме и при АИЭ**

	Контрольная группа (n=24)	Группа с АИЭ (n=36)
CD19+CD5+, %	2,8±0,3	<b>5,9±0,7*</b>
CD19+CD5+, кл/мкл	79±11	<b>212±25*</b>
CD5+CD27+, % от В-лимфоцитов	3,0±0,4	4,4±0,5
CD5+CD27+, кл/мкл	9,0±1,0	<b>36±4*</b>
p<0,05		

проведенной терапии Полиоксидонием стала нормализация показателей системного иммунитета:

1. соотношение субпопуляций НК-клеток приблизилось к группе контроля;
2. цитотоксическая активность НК-клеток снизилась и пришла в норму;
3. уменьшилась спонтанная продукция провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- $\alpha$  – ФНО- $\alpha$ , интерлейкина-6 – ИЛ-6, интерферона- $\gamma$  – ИФН- $\gamma$ ).

У 19 из 47 женщин в последующем наступила беременность (40,4%).

Особую группу составили пациентки, у которых сформировался аутоиммунный эндометрит (АИЭ), характерными чертами которого стало повышение количества В-лимфоцитов и плазматических клеток в эндометрии с последующим формированием аутоантител. Результаты иммуногистохимического исследования эндометрия отличались достоверным повышением не только клеток-киллеров, но и В-лимфоцитов и плазматических клеток (табл. 9).

При исследовании субпопуляций В-лимфоцитов ПК у пациенток этой группы обнаружено достоверное увеличение количества аутореактивных В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD5+ и аутореактивных В-лимфоцитов памяти CD5+CD27+ (табл. 10).

Учитывая особенности данной группы пациенток и имеющиеся показания для применения Полиоксидония при аутоиммунных воспалительных заболеваниях, женщинам этой группы была назначена следующая терапия:

- Полиоксидоний® 6 мг внутримышечно через 2 дня на 3-й, всего 15 инъекций.
- Кроме этого, Метипред 4 мг в течение месяца в 1-й половине дня.

В результате проведенной терапии показатели ПК, оценивающие субпопуляции В-лимфоцитов, пришли в норму, как, впрочем, и субпопуляции НК и их цитотоксическая активность. Клиническим результатом было наступление беременности у 12 из 36 женщин (33,3%). Таким образом, исследование в ПК популяций НК, В-клеток, изучение цитотоксической активности НК-клеток позволяет мониторировать результаты проводимой иммуностропной терапии без использования на данном этапе повторных биопсий эндометрия [13]. Полученные клинические результаты подтверждают эффективность применения препарата Полиоксидоний® в лечении ХЭ не только в качестве иммуностропной терапии для улучшения результатов лечения хронических воспалительных заболеваний половых органов, но и для восстановления репродуктивной функции.

#### Литература/References

1. Михнина Е.А. Морфофункциональное состояние эндометрия у женщин с бесплодием и невынашиванием беременности. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. 2009. / Mikhkina E.A. Morfofunktsional'noe sostoianie endometriia u zhenschin s besplodiem i nevnashivaniem beremennosti. Avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. 2009. [in Russian]
2. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. Hum Reprod 1999; 14: 2208–13.
3. Park DW, Lee HJ, Park CW et al. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. Am J Reprod Immunol 2010; 63: 173–80.
4. Van den HM, Peralta C, Bachar S et al. Trafficking of peripheral blood CD56 (bright) cells to the decidualizing uterus – new tricks for old dogmas? J Reprod Immunol 2005; 67: 21–34.
5. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. / Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudriavtsev I.V., Chereshev V.A. Protochnaia tsitometriia v meditsine i biologii. Ekaterinburg: RIO UrO RAN, 2014. [in Russian]
6. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood 2001; 97: 3146–51.
7. Fukui A, Funamizu A, Yokota M et al. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and pre-eclampsia. J Reprod Immunol 2011; 90: 105–10.
8. Horne AW, Stock SJ, King AE. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. Reproduction 2008; 135: 739–49.
9. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. Am J Reprod Immunol 2010; 63: 434–44.
10. Lee SK, Kim CJ, Kim D-J, Kang J-H. Immune cells in the female reproductive tract. Immune Network 2015; 1: 16–26.
11. Sentman CL, Wira CR, Eriksson M. NK-cell function in the human female reproductive tract. Am J Reprod Immunol 2007; 57: 108–15.
12. Carp JA, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. J Autoimmun 2012; 38: 266–74.
13. Givan AL, White HD, Stern JE et al. Flow cytometric analysis of leucocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. Am J Reprod Immunol 1997; 38: 350–9.
14. Бычкова Н.В. Анализ содержания ДНК методом проточной цитометрии. Возможности применения в клинической практике. Тверь: Триада, 2015. / Bychkova N.V. Analiz sodержaniia DNK metodom protochnoi tsitometrii. Vozmozhnosti primeneniia v klinicheskoi praktike. Tver': Triada, 2015. [in Russian]

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Калинина Наталья Михайловна – д-р мед. наук, проф., клин. иммунолог, гл. науч. сотр. отд. лабораторной диагностики ФГБУ «ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова» МЧС России, проф. каф. терапии и интегративной медицины ИДПО «Экстремальная медицина». E-mail: doctkalin@mail.ru

По материалам журнала CONSILIUM MEDICUM, 2015, том 17, №6.