

В.А. Колмык¹, Р.А. Насыров¹,
Г.Ф. Кутушева¹, В.В. Петров²

Роль специфической иммуногистохимической методики в диагностике хронического эндометрита

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты специфической иммуногистохимической методики в диагностике хронического эндометрита. Обследовано 20 женщины в возрасте 18–40 лет с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом. С целью верификации хронического эндометрита была выполнена биопсия эндометрия при помощи кюретки Pipelle на 7–10 день менструального цикла, в среднюю и позднюю фазу пролиферации, с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием эндометрия. Хронический эндометрит диагностирован у 6 пациенток. Экспрессия рецепторов к прогестерону и эстрогенам у них была от умеренной до выраженной ($S_{\Sigma}=120-250$, $S_{np}=160-250$). У одной пациентки выявлен антиген к вирусу простого герпеса и вирусу Эпштейна – Барр (интенсивность реакции – от умеренной до резко положительной). При этом во всех случаях имела место умеренная лимфоидная инфильтрация стромы. Еще у одной пациентки выявление антигенов к вирусу простого герпеса сочеталось с микоплазменной инфекцией. Во всех случаях, когда гистологически и клинически диагностирован хронический эндометрит присутствовала бактериально-вирусная инфекция (у шести пациенток – *Clostridium Coccoides*, *Propionbacterium freudenreihii*, у пяти – *Clostridium ramosus*, у четырех – *Actinomyces viscosus*. При этом у всех обнаружены антигены к вирусу простого герпеса, Это указывает на смешанный этиологический характер развивающегося заболевания, что сопровождается клинически сложным течением воспалительного процесса. Ни у одной из пациенток с хроническим эндометритом не было выявлено снижения уровня экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену.

Ключевые слова: хронический эндометрит, иммуногистохимический анализ, вирус простого герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейн – Барр.

Введение. В настоящее время, несмотря на использование современных методов диагностики и применения широкого спектра антимикробных препаратов, частота воспалительных заболеваний половых органов не снижается. По данным Национального центра Америки заболеваемости, в Соединенных Штатах Америки (США) ежегодно регистрируют около 1 млн случаев воспалительных заболеваний органов малого таза, т.е. каждая 10-я женщина в течение репродуктивного возраста имеет воспаление органов малого таза, причем у каждой 4-й из них возникают осложнения [6]. В России гинекологическая заболеваемость составляет от 28 до 34% и не имеет тенденции к снижению. Хронические воспалительные процессы характеризуются тенденцией к малосимптомному и бессимптомному течению, изменению этиологической структуры в сторону вирусной и условно-патогенной микрофлоры и часто становятся причиной нарушений репродуктивной функции, неудач программ вспомогательных репродуктивных технологий, репродуктивных потерь [2, 4].

В последние годы особый интерес исследователей в области репродукции прикован к патологии эндометрия. Хронический эндометрит (ХЭ) – клинкоморфологический синдром, при котором в результате длительного повреждения эндометрия инфекционным агентом возникают морфофункциональные изме-

нения, нарушающие циклическую трансформацию и рецепторный аппарат слизистой оболочки тела матки [3]. Это заболевание развивается преимущественно у женщин репродуктивного возраста (26–35 лет).

По данным И.Ф. Баринского [1], Г.Т. Сухих [3], факторами риска развития ХЭ являются все инвазивные вмешательства в полости матки (гистероскопия, выскабливание полости матки, биопсия эндометрия, гистеросальпингография, манипуляции в программах вспомогательных репродуктивных технологий и др.), инфекционно-воспалительные осложнения после беременностей и родов, использование внутриматочных спиралей, инфекции влагалища и шейки матки, бактериальный вагиноз, деформации полости матки с нарушением циклического отторжения эндометрия, лучевая терапия в области органов малого таза. ХЭ приобретает не только медицинское, но и социальное значение, так как часто вызывает нарушения репродуктивной функции, являясь причиной бесплодия, неудачных попыток экстракорпорального оплодотворения, невынашивания беременности, осложненного течения беременности и родов [3]. Клинически бессимптомный воспалительный процесс в эндометрии представляет собой наличие ассоциаций облигатно-анаэробных микроорганизмов, а также персистенцию условно-патогенной флоры и персистенцию вирусов. По данным Г.Т. Сухих [3], наиболее характерным при

хроническом эндометрите у женщин является наличие ассоциаций 2–3 видов облигатно-анаэробных микроорганизмов и вирусов.

Среди персистирующих вирусов наибольшее значение имеют: герпес-вирусные инфекции (вирус простого герпеса (ВПГ), герпес-зостер), цитомегаловирус (ЦМВ), энтеровирусные инфекции (Коксаки А, В), аденовирусы. Герпетический эндометрит, как правило, возникает у женщин, страдающих атипичными или бессимптомными формами генитального герпеса и вызван длительной персистенцией ВПГ в эндометрии [1, 2, 5].

В настоящее время нет четких критериев поэтапной диагностики ХЭ и программы восстановления репродуктивной функции женщин с наличием ХЭ. Большинство ХЭ протекает латентно и не имеет клинических проявлений инфекции. Трудности диагностики, клинической и морфологической верификации ХЭ влияют на оценку частоты заболевания. Частота ХЭ от общего числа биопсий эндометрия колеблется от 2,3 до 19,2%. Диагностические подходы верификации ХЭ непрерывно видоизменялись на протяжении последних десятилетий: от формулировки «диагноза отчаяния», после исключения других причин, вызывающих нарушение менструального цикла, до «золотых стандартов» морфологического подхода, позволившего шире взглянуть на эту проблему. Сегодня диагноз базируется на комплексной оценке ряда клинических, морфологических и инструментальных данных. Комплексный метод диагностики ХЭ позволил улучшить верификацию данной патологии на 64,6% по сравнению с гистологическим подтверждением ХЭ после проведения только кюретажа эндометрия.

Особое внимание при верификации ХЭ уделяется иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию эндометрия. Последнее является высокоспецифичным и высокочувствительным и позволяет не только идентифицировать тип инфекционного агента, но и установить фазу процесса, что имеет существенную роль для определения тактики лечения. Проводится определение количества рецепторов в эндометрии. С помощью маркеров CD138, CD20, CD8, CD4 определяется количество плазматических клеток эндометрия. Это позволяет увеличивать точность морфологической верификации ХЭ на 25–30%. Также определяется выраженность экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену, выявляется наличие антигенов к возбудителям данного заболевания.

Цель исследования. Выявить связь наличия хронического воспалительного процесса в полости матки с персистенцией ВПГ, ЦМВ, вируса Эпштейн – Барр. Провести анализ между клиническими проявлениями и данными гистологического и иммуногистохимического исследования у пациенток с ХЭ.

Материалы и методы. Обследовано 20 женщин в возрасте 18–40 лет (средний возраст $31,5 \pm 1,5$ лет) с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом. Критерием включения в исследование являлось

наличие в анамнезе у 15 (75%) пациенток замершей беременности, у 1 (5%) пациентки – бесплодия, у 3 (15%) пациенток – выскабливания стенок полости матки по поводу прерывания беременности и у 1 (5%) пациентки – самопроизвольного позднего выкидыша. В анамнезе роды были у 15 (75%) пациенток, из них 1 роды у 6 (40%) пациенток, 2 родов у 9 (60%) пациенток. Родоразрешены через естественные родовые пути были 11 (73,3%) пациенток, путем операции кесарево сечение 4 (28,7%) пациентки. Критерием исключения было наличие тяжелой соматической патологии и гинекологической патологии (миома матки, кисты яичников). Обследуемым женщинам наряду с обычным клинико-лабораторным исследованием была проведена пайпельбиопсия эндометрия с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием биоптата. Оценивалась выраженность экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, проводилось определение антигенов ВПГ, ЦМВ, вируса Эпштейн – Барр.

Аспират из полости матки для дальнейшего гистологического исследования получали путем пайпельбиопсии эндометрия в асептических условиях и при письменном согласии женщины. Для исключения ошибочных морфологических заключений и верификации ХЭ биопсия эндометрия производилась с помощью аспирационной кюретки Pipelle только на 7–10 день менструального цикла, т.е. в среднюю и позднюю фазу пролиферации. Для идентификации патогенных микроорганизмов в эндометрии использовалась хромато-масс-спектрометрия. Для морфологических исследований использовали серийные парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Полученные образцы ткани эндометрия фиксировали 10% раствором формалина в течение 24 ч.

После соответствующей обработки образцы эндометрия заключали в парафин, парафиновые срезы толщиной микрон окрашивали гематоксилином и эозином. Для верификации диагноза использовались следующие морфологические признаки ХЭ: наличие в эндометрии воспалительных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоидных элементов с включением макрофагов и эозинофилов, расположенных чаще вокруг желез и кровеносных сосудов, реже диффузно, наличие в инфильтратах плазматических клеток, очаговое фиброзирование стромы эндометрия, склеротические изменения стенок спиральных артерий эндометрия.

ИГХ-реакции проводили в ступенчатых парафиновых срезах пероксидазно-антипероксидазным методом с демаскировкой антигенов в сверхвысокотемпературной печи. Для визуализации реакций применяли универсальный пероксидазный набор LSAB+kit фирмы «Dako» (США). Негативные контрольные реакции проводили с мышинной и кроличьей сывороткой (нормальный мышинный и кроличий иммуноглобулин). Ядра докрашивали гематоксилином Майера. Использовали мышинные моноклональные антитела к эстрогеновым рецепторам (клон 6F11 фирмы «Leica»

(США) и прогестероновым рецепторам (клон R6R-312 фирмы «Novocastra» (Великобритания), а также поликлональные антитела к ВПГ фирмы «Дасо» (Дания), моноклональные антитела к ЦМВ и вирусу Эпштейна – Барр фирмы «Novocastra» (Великобритания). Количественный анализ результатов иммуногистохимических реакций проводили под увеличением объектива $\times 400$.

ИГХ-реакция в строме оценивалась только в ее резидентных клетках. Интенсивность ИГХ реакции к эстрогену и к прогестерону в ядрах клеток эпителия желез и стромы оценивали по методике гистологического счета H-score по формуле:

$$S=1a+2b+3c,$$

где *a* – % слабо окрашенных ядер клеток, *b* – % умеренно окрашенных ядер клеток, *c* – % сильно окрашенных ядер клеток [7]. Степень выраженности экспрессии к эстрогену и прогестерону расценивали так: 0–10 баллов – отсутствие экспрессии, 11–100 – слабая экспрессия, 101–200 – умеренная экспрессия, 201–300 – выраженная экспрессия. Интенсивность реакции антигенов к ВПГ, ЦМВ, вирусу Эпштейна – Барр оценивалась полуколичественным способом: слабая «+» – 1–10 клеток, имеющих положительную окраску, умеренная «++» – 11–20 клеток, имеющих положительную окраску, резко положительная «+++» – 21 и более клеток имеющих положительную окраску ядер или цитоплазмы во всем срезе.

Исследование проводилось на базе женской консультации № 22 (Санкт-Петербург) и кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Результаты и их обсуждение. По данным гистологического исследования ХЭ был диагностирован у 6 пациенток. У одной пациентки с вторичным бесплодием были выявлены антигены к ВПГ и Эпштейна – Барр (интенсивность реакции к ВПГ – «+++», к вирусу Эпштейна – Барр – «+++»), рис. 1. Экспрессия рецепторов к прогестерону и эстрогену в данном случае была расценена как умеренная ($S_{\text{э}}=150$, $S_{\text{пр}}=180$). При этом имела место умеренная лимфоидная инфильтрация стромы. Еще у одной пациентки был выявлен

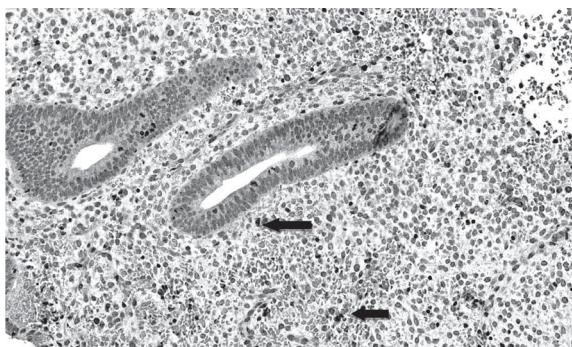


Рис. 1. Антигены к ВПГ в клетках стромы эндометрия, ув. $\times 400$

антиген к ВПГ и ЦМВ (интенсивность реакции к ВПГ – «+++», ЦМВ – «+++») (рис. 2), что клинически проявилось замиранием беременностей на ранних сроках.

Экспрессия рецепторов к прогестерону и эстрогену в конкретном случае была расценена как выраженная ($S_{\text{э}}=205$, $S_{\text{пр}}=210$), при этом имела место выраженная лимфоидная инфильтрация стромы. У 4 пациенток выявлен антиген к ВПГ (интенсивность реакции – у 2 пациенток – «+», и еще у 2 пациенток – «+++»), что клинически также проявилось замиранием беременностей. Во всех 4 случаях имела место умеренная лимфоидная инфильтрация стромы. Ультразвуковое исследование органов малого таза позволило выявить у одной пациентки признаки ХЭ (гипоплазия эндометрия, гиперэхогенный базальный слой, расширение полости матки до 5 мм). При оценке выраженности экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену у последних 4 пациенток, в одном случае был умеренный уровень экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену ($S_{\text{э}}=120$, $S_{\text{пр}}=160$), в трех случаях – выраженная экспрессия рецепторов к прогестерону и эстрогену ($S_{\text{э}}=220$, $S_{\text{пр}}=240$; $S_{\text{э}}=250$, $S_{\text{пр}}=230$; $S_{\text{э}}=210$, $S_{\text{пр}}=250$). У одной пациентки выявление антигенов к ВПГ сочеталось с микоплазменной инфекцией. У пациенток с диагностированным ХЭ хромато-масс-спектрометрически выявлены следующие возбудители: *Clostridium Coccoides* ($n=6$), *Clostridium ramosus* ($n=5$), *Propionibacterium freudenreihii* ($n=6$), *Actinomyces viscosus* ($n=4$). Это указывает на смешанный этиологический характер развивающегося заболевания (микст-инфекция), что сопровождается клинически сложным течением воспалительного процесса.

Заключение. У женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом специфическая иммуногистохимическая методика позволила диагностировать бактериально-вирусную инфекцию. Во всех случаях были обнаружены *Clostridium Coccoides*, *Propionibacterium freudenreihii* и антигены к ВПГ. Ни у одной из пациенток с ХЭ не было выявлено снижения уровня экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену. В ходе исследования определена смешанная бактериально-вирусная этиология ХЭ, что имеет

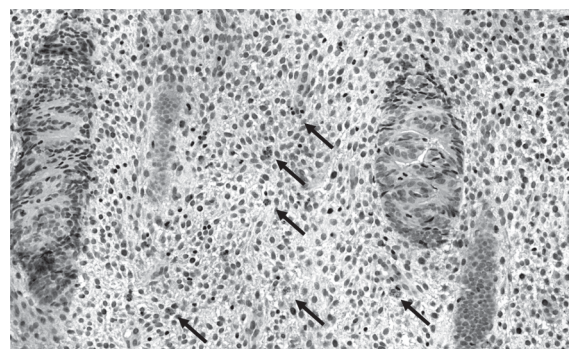


Рис. 2. Антигены к ЦМВ в клетках стромы эндометрия, ув. $\times 400$

важное значение при подборе фармакологических препаратов с целью элиминации возбудителей.

Литература

1. Баринский, И.Ф. Герпесвирусные инфекции – иммунодефицитные заболевания XXI века. Актуальные проблемы герпесвирусных инфекции / И.Ф. Баринский – М., 2004. – С. 42.
2. Макаров, О.В. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет / О.В. Макаров, Л.В. Ковальчук, В.Л. Ганковская – М., ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 196 с.
3. Сухих, Г. Т., Шуршалина А. В. Хронический эндометрит: руководство / Г.Т. Сухих, А.В. Шуршалина. – М., ГЭОТАР-Медиа. 2010. – 64 с.
4. Сидельникова, В. М. Привычная потеря беременности / В.М. Сидельникова. – М., Триада-Х, 2005. – 304 с.
5. Шишкин, М.К. Герпесвирусные инфекции. / М.К. Шишкин, В.А. Исаков // Избранные вопросы терапии инфекционных болезней: руководство для врачей. – СПб., 2005 – С. 636–640.
6. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment / E. Cicinelli [et al.] // Reproductive sciences. – 2014. – Vol. 21 № 5. – P. 640–647.
7. A multicentre study into the reliability of steroid receptor / R.A. McClelland [et al.] // Eur. j. cancer. – 1991. – Vol. 27. – P. 711–715.

V.A. Kolmyk, R.A. Nasyrov, G.F. Kutusheva, V.V. Petrov

The role of specific immunohistochemical techniques in the diagnosis of chronic endometritis

Abstract. The results of specific immunohistochemical techniques in the diagnosis of chronic endometritis are presented. A total of 20 women aged 18–40 years with a history of obstetric and gynecological history were observed. In order to verify the chronic endometritis endometrial biopsy was performed using a curette Pipelle 7–10 days of the menstrual cycle, in the middle and late phase of proliferation, followed by histological and immunohistochemical study of the endometrium. Chronic endometritis was diagnosed in 6 patients. Expression of progesterone receptor and estrogen they had moderate to severe ($Se=120-250$, $Spr=160-250$). One patient was identified with antigen to herpes simplex virus and Epstein – Barr virus (intensity of reaction – from moderate to strongly positive). In all cases, there was a moderate lymphoid infiltration of the stroma. Another one patient antigen detection to herpes simplex virus was associated with mycoplasma infection. In all cases in which histologically and clinically diagnosed chronic endometritis was present bacterial and viral infection were found (in six patients – *Clostridium Coccoides*, *Propionbacterium freudenreihii*, in five – *Clostridium ramosus*, in four – *Actinomyces viscosus*). In this case, all antigens were found to herpes simplex virus this indicates developing character mixed etiological disease is accompanied by clinically challenging during the inflammatory process. None of the patients with chronic endometritis showed no reduction in the level of expression of receptors for estrogen and progesterone.

Key words: chronic endometritis, immunohistochemical research, virus of simple herpes, cytomegalovirus, virus Epstein – Barr.

Контактный телефон: +7-961-806-94-44; e-mail: vera-kolmyk@mail.ru