

© А. Н. Эллиниди¹,
Д. Ф. Костючек¹, Л. Б. Дрыгина²,
Е. А. Михнина³, В. Н. Эллиниди²

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХЛАМИДИЙНОМ САЛЬПИНГООФОРИТЕ

¹СПГМА им. И. И. Мечникова, кафедра
акушерства и гинекологии

²ФГУЗ Всероссийский центр
экстренной и радиационной медицины
им. А. М. Никитова МЧС России

³НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

УДК: 618.12-002-036.12+618.145-07

■ Для оценки морфофункционального состояния эндометрия было выполнено гистологическое и иммуногистохимическое исследование соскобов эндометрия полученных при гистероскопии эндометрия у 58 женщин (средний возраст 30, $5 \pm 3,8$ лет) страдающих хроническим сальпингоофоритом и нарушением репродуктивной функции. Определение CD20, CD56, CD16, HLA-DR показателей местного иммунитета в эндометрии выполняли иммуногистохимическим EnVision методом с применением моноклональных антител фирмы DAKO. Методом ИФА в сыворотке крови женщин определяли два вида Ig G к белку теплового шока — Hsp60 и главному белку наружной мембраны MOMP, а также к плазмидному белку pgp3 *Chlamydia trachomatis* с использованием тест-систем фирмы ВекторБест (Россия). Результаты исследования показали: антитела *Chlamydia trachomatis* (AX) HSP60 и MOMP\pgp3 были обнаружены в сыворотке крови у 45 (77,6 %) женщин из 58, что подтверждало хламидийную этиологию хронических сальпингоофоритов у этих женщин. В зависимости от обнаруженного титра AX HSP60 и MOMP\pgp3 антител в образцах сыворотки крови были выделены две группы. В первую группу вошли 26 (57,8 %) женщин с хроническим сальпингоофоритом хламидийной этиологии, у которых в сыворотке крови определялись оба вида антител — HSP60 и MOMP\pgp3. Во вторую группу были включены 19 (42,2 %) женщин, у которых в сыворотке определялись только AX MOMP\pgp3. При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании эндометрия у 28 (62,2 %) из 45 женщин был диагностирован хронический эндометрит (ХЭ). Таким образом, полученные результаты показывают, что хронический хламидийный сальпингоофорит у каждой второй женщины ассоциируется с хроническим эндометритом и протекает с различным иммунным ответом. Дальнейшее изучение состояния иммунной системы ее клеточного и гуморального звеньев, показателей неспецифической резистентности, позволит разработать и улучшить эффективность терапии направленной на сохранение репродуктивного здоровья женщины.

■ **Ключевые слова:** хронический сальпингоофорит; антихламидийные антитела к Hsp60 и MOMP /pgp3; хронический эндометрит.

В последние годы отмечается неуклонный рост воспалительных заболеваний репродуктивной системы женщин, среди которых ведущее место занимают хронические рецидивирующие сальпингоофориты и хронические эндометриты [7].

Считается, что основным этиологическим фактором в этиопатогенезе хронического сальпингоофорита является хламидийная инфекция [1, 13]. Хламидийный сальпингоофорит, как правило, протекает малосимптомно, что обусловлено своеобразием биологии *Chlamydia trachomatis*.

Преобладание малосимптомного течения заболевания, невозможность использования прямых методов диагностики хламидийной инфекции при сальпингоофоритах и трубном бесплодии, появление абберантных форм хламидий и развитие персистирующих форм хламидийной инфекции определяют необходимость предпочтительного использования в диагностике непрямых методов — специфических тестов определения в сыво-

ротке крови антител к белкам основной наружной мембраны *Chlamydia trachomatis* и белку теплового шока Hsp60 [10, 15, 16].

Хроническая хламидийная инфекция является индуцирующим фактором в развитии фиброзных спаек, что в дальнейшем приводит к развитию трубного бесплодия [5, 11, 9], экстрагенитальной беременности [17], а длительная персистенция патогена может привести к опосредованному вовлечению в воспалительный процесс эндометрия, от структурно-функционального состояния которого зависит успешная nidация оплодотворенной яйцеклетки, развитие плода и благоприятный исход беременности.

Цель исследования

Оценить морфофункциональное состояние и показатели местного иммунитета эндометрия у женщин с хроническим хламидийным сальпингоофоритом в плане подготовки к планируемой беременности.

Таблица 1

Распределение Ig G к MOMP+pgp3 и Hsp60 *Chlamydia trachomatis* в сыворотке крови у женщин с хроническим сальпингоофоритом

Группы пациенток			Уровень Ig G AX Hsp60 К позитивности > 1,1 (ед)	Уровень Ig G AX MOMP+pgp3 К позитивности > 1,1 (ед)
	N	%	3,26±1,89	3,57±1,81
1 группа	26	57,8		
2 группа	19	42,2	0	1,14±1,29

Таблица 2

Распределение CD56, CD16, CD20 и HLA-DR в эндометрии у женщин с/и без ХЭ и наличием в сыворотке Ig G к Hsp60 +MOMP/pgp3 *Chlamydia trachomatis*

Группы	К позитивности IgG к Hsp60/ MOMP+pgp3 <i>Chlamydia trachomatis</i>	Количество лимфоцитов в строме эндометрия (в поле зрения)			
		CD56	CD16	CD20	HLA-DR
1. Без ХЭ, n=8 (30,8%)	2,7±1,2/2,8±0,96	14,4±4,5	17,2±5,7	0,6±0,4	13,4±4,0
2. ХЭ, n=18 (69,2%)	3,3±1,1/3,6±1,3	27,8±12,6*	26,5±8,3*	8,1±6,5*	13,1±3,5

* — тест Манна–Уитни статистически достоверный (p<0,05)

Материал и методы

Исследуемую группу составили 58 женщин (средний возраст 30,5±3,8 лет) страдающих хроническим сальпингоофоритом и нарушением репродуктивной функции. Методом ИФА в сыворотке крови женщин определяли два вида Ig G к белку теплового шока Hsp60 и главному белку наружной мембраны MOMP, а также к плазмидному белку pgp3 *Chlamydia trachomatis* с использованием тест-систем фирмы ВекторБест (Россия). Результат серологического исследования оценивали как индекс позитивности — К позитивности равный ОП образца/ОП критическое. Положительным результат считался при К позитивности более 1,1.

Для оценки состояния эндометрия было выполнено гистологическое исследование соскобов эндометрия полученных при гистероскопии эндометрия. Определение CD20, CD56, CD16, HLA-DR показателей местного иммунитета в эндометрии выполняли иммуногистохимическим EnVision методом с применением моноклональных антител фирмы DAKO. Результаты ИГХИ оценивали полуколичественным способом на основании патента [6].

Все женщины дополнительно были обследованы методом ПЦР на определение ДНК *Chlamydia trachomatis* в мазках из цервикального канала. Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе Statistica 5.0.

Результаты исследования и их обсуждение

В исследуемой группе в 48% случаев хронический сальпингоофорит привел к двусторонней непроходимости маточных труб, а в 15% случаев сочетался с аденомиозом.

Антитела *Chlamydia trachomatis* (AX) HSP60 и MOMP/pgp3 были обнаружены в сыворотке крови у 45 (77,6%) женщин из 58, что подтверждало хламидийную этиологию хронических сальпингоофоритов у этих женщин.

В зависимости от обнаруженного титра AX HSP60 и MOMP/pgp3 антител в образцах сыворотки крови были выделены две группы. В первую группу вошли 26 (57,8%) женщин с хроническим сальпингоофоритом хламидийной этиологии, у которых в сыворотке крови определялись оба вида антител — HSP60 и MOMP/pgp3. Во вторую группу были включены 19 (42,2%) женщин, у которых в сыворотке определялись только AX MOMP/pgp3.

Средние значения К позитивности антихламидийных антител представлены в таблице 1.

При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании эндометрия у 28 (62,2%) из 45 женщин был диагностирован хронический эндометрит (ХЭ). При этом в первой группе (MOMP+pgp3 и Hsp60) — у 18 (69,2%) женщин, а во 2 группе (с наличием только MOMP) хронический эндометрит был обнаружен у 10 (52,6%) женщин (табл. 2–3).

В строме эндометрия у женщин (1-й и 2-й групп) без хронического эндометрита количество CD20 и HLA-DR было в пределах нормы, отмечалось незначительное увеличение натуральных киллерных клеток (CD56 CD16) в 1-й группе.

Хламидийно ассоциированные эндометриты характеризовались высоким содержанием в строме эндометрия В-лимфоцитов, которые диффузно инфильтрировали строму эндометрия, а в 11% случаях (5 из 45) формировали очаговые плотные лимфоидные скопления по типу лимфоидных фолликулов

Таблица 3

Распределение CD56, CD16, CD20 и HLA-DR в эндометрии у женщин с/и без ХЭ и наличием в сыворотке Ig G к MOMP/pgp3 *Chlamydia trachomatis*

Группы	К позитивности Ig G к MOMP/ pgp3 <i>Chlamydia trachomatis</i>	Количество лимфоцитов в строме эндометрия (в поле зрения)			
		CD56	CD16	CD20	HLA-DR
1. Без ХЭ, n=9 (47,4%)	3,7±1,3	10,6±5,3	13,3±3,8	1,6±1,1	9,6±4,2
2. ХЭ, n=10 (52,6%)	1,16±0,4	21,6±7,6*	26,2±5,3*	18,9±9,6*	21,3±8,46*

* — тест Манна–Уитни статистически достоверный ($p < 0,05$)



Рис. 1. В строме эндометрия очаговая выраженная мононуклеарная инфильтрация с формированием лимфоидного фолликула. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 250

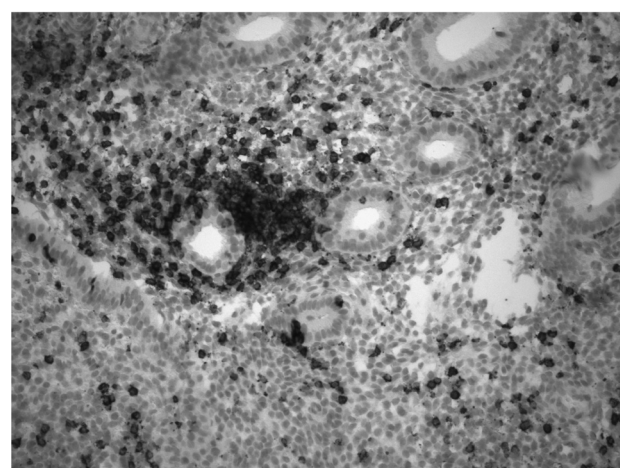


Рис. 2. CD20 в строме эндометрия. Иммуногистохимическая реакция EnVision методом. Ув. × 250

(рис. 1). Отмечалась неполноценная секреторная трансформация желез, отставание в развитии и очаговый фиброз стромы. Большинство исследователей отмечают, что достоверным показателем хронического эндометрита является обнаружение в эндометрии, в первую очередь плазматических клеток, В-лимфоцитов, макрофагов и лимфоцитарной инфильтрации с формированием лимфоидных фолликулов [4, 8, 14, 18]. Однако начальным проявлением хронического воспаления является появление В-лимфоцитов, что указывает на наличие гуморального иммунного ответа. В-лимфоциты после связывания антигена активируются и начинают пролиферировать и формировать клон специфических плазматических клеток, которые являются конечным этапом деятельности В-лимфоцитов [3].

При иммуногистохимическом исследовании в эндометрии с хроническим эндометритом во второй группе среднее количество В-лимфоцитов (CD20) в поле зрения было в 3 раза выше, в сравнении с первой группой. Следует отметить, что во второй группе характер распределения В-лимфоцитов в строме эндометрия чаще был диффузный и в 5 случаях формировались крупные лимфоидные фолликулы из В-лимфоцитов (рис. 2). Тогда как в группе с появлением HSP60 антител среднее количество В-лимфоцитов уменьшалось в строме эндометрия

и имело больше очаговый характер распределения, что возможно обусловлено их переходом в плазматические клетки. Перигландулярные инфильтраты в этой группе были представлены NK-клетками (CD56 CD16).

Существует гипотеза, что местом персистенции хламидий в эндометрии является не постоянно обновляющийся эпителиальный слой слизистой, а субэпителиальные ткани, куда хламидии проникают в макрофагах и продолжают персистировать в лимфоидных фолликулах (герминативных центрах).

При статистическом анализе AX Hsp60 прямо пропорционально зависели от наличия AX MOMP (коэффициент корреляции $r = 0,51$, $p < 0,05$). Выделенные группы достоверно отличались по показателям NK и В-лимфоцитов (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Была выявлена статистически достоверная прямая корреляция между уровнем AX Hsp60 и количеством в эндометрии CD 56 ($r = 0,46$, $p < 0,05$) и HLA-DR ($r = 0,71$, $p < 0,05$) и обратная между CD20 ($r = -0,41$, $p < 0,05$), где r — коэффициент корреляции Спирмена. Прямая статистическая корреляция была обнаружена между уровнем AX MOMP и количеством в эндометрии ЕК-клеток (CD16) ($r = 0,47$, $p < 0,05$), CD20 ($r = 0,37$, $p < 0,05$).

Таким образом, специфический активный воспалительный процесс в эндометрии протекает с нарастанием в сыворотке крови индекса позитивности Ig G к MOMP/pgp3 *Chlamydia trachomatis*, и характеризуется повышением среднего количества В-лимфоцитов и HLA-DR в строме эндометрия, свидетельствующих об активации хронического воспаления и, по-видимому, об увеличении количества абберантных форм хламидий в макрофагах и лимфоцитах эндометрия.

Тогда как с появлением АХ Hsp60 и снижением АХ MOMP повышается в эндометрии количество NK клеток (CD 56, СВ16), а количество В-лимфоцитов достоверно снижается, что указывает на переход хронического воспалительного процесса в стадию персистенции и возможно развития аутоиммунного воспаления.

Изменение соотношения этих двух антител в патогенезе хронической хламидийной инфекции является предметом серьезных дискуссий. Известно, что высокие дозы ИФН-гамма ингибируют рост хламидий, а низкие индуцируют развитие морфологически абберантных форм включений. В работе Битти В. Л. и соавт. [2] показано, что при низком воздействии ИФН-гамма на HLA-клетки инфицированные *Chlamydia trachomatis*, нарастал титр IgG Hsp60 и уменьшалось количество IgG MOMP. У персистирующих хламидий изменена не только морфология, но и экспрессия ключевых ее антигенов. У абберантных форм отмечается снижение синтеза всех основных структурных компонентов, придающих основную прочность клеточной стенке (MOMP и ЛПС), и идет непрерывный синтез белка теплового шока, что и обуславливает механизм персистенции хламидий [12].

Хроническая персистенция и/или реинфекция бессимптомной или не диагностированной хламидийной инфекции приводит к постоянной или повторяющейся конфронтации между иммунной системой человека и хламидийными HSP60 (сHSP60). Иммунный ответ к устойчивым эпитопам хламидийных HSP60 и параллельно к собственным HSP60-аутоантителам не может быть распознан без специфичной, стандартизованной системы определения.

Таким образом, полученные результаты показывают, что хронический хламидийный сальпингоофорит у каждой второй женщины ассоциируется с хроническим эндометритом и протекает с различным иммунным ответом.

Дальнейшее изучение состояния иммунной системы ее клеточного и гуморального звеньев, показателей неспецифической резистентности, позволит разработать и улучшить эффективность терапии направленной на сохранение репродуктивного здоровья женщины.

Литература

1. Аковбян В. А. Урогенитальная инфекция: 25 лет спустя. — М., 2005.
2. Битти В. Л., Моррисон Р. П., Бирн Д. И. Персистенция хламидий: от клеточных культур до патогенеза хламидийной инфекции // ЗППП. — 1995. — № 6. — С. 3–18.
3. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. — М.: МИА, 2003. — 604 с.
4. Кондриков Н. И. Патология матки. — М.: Практическая медицина, 2008. — 334 с.
5. Медведев В. И., Зайнетдинова Л. Ф., Теплова С. Н. Микрофлора репродуктивной системы у женщин с трубноперитонеальным бесплодием // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. — 2008. — № 3. — С. 58–62.
6. Патент РФ № 2236013 Способ диагностики хронического эндометрита и характера воспаления / Михнина Е. А., Эллинаиди В. Н., Давыдова Н. И., Калинина Н. М. — от 10.02.2003.
7. Тихомиров А. Л., Сарсания С. И. Современные подходы к лечению воспалительных заболеваний женских половых органов: методические рекомендации. — М., 2005. — 32 с.
8. Association between *Chlamydia trachomatis* and abnormal uterine bleeding / Toth M. [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. — 2007. — Vol. 57, N 5. — P. 361–366.
9. Association of MICA gene polymorphisms with *Chlamydia trachomatis* infection and related tubal pathology in infertile women / Mei B. [et al.] // Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 24, N. 12. — P. 3090–3095.
10. *Chlamydia trachomatis* infection in women with secondary infertility / Malik A. [et al.] // Fertil. Steril. — 2009. — Vol. 91, N. 1. — P. 91–95.
11. *Chlamydia trachomatis* urogenital infection in women with infertility / Wilkowska-Trojniel M. [et al.] // Adv. Med. Sci. — 2009. — Vol. 54, N 1. — P. 82–85.
12. Chlamydial Hsp60-2 is iron responsive in *Chlamydia trachomatis* serovar E-infected human endometrial epithelial cells *in vitro* / La Rue R. W. [et al.] // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75, N. 5. — P. 2374–2378.
13. Further observations, mainly serological on a cohort of women with or without pelvic inflammatory disease / Taylor-Robinson D. [et al.] // Int. J. STD. AIDS. — 2009. — Vol. 120, N 10. — P. 712–718.
14. Identification and treatment of endometritis / Cravello L. [et al.] // Contracept. Fertil. Sex. — 1997. — Vol. 25. — P. 585–586.
15. Screening strategies for tubal factor subfertility / der Hartog J. E. [et al.] // Hum. Reprod. — 2008. — Vol. 23, N. 8. — P. 1840–1848.
16. The presence of serum antibody to the chlamydial heat shock protein (CHP60) as a diagnostic test for tubal factor infertility / Claman P. [et al.] // Fertil Steril. — 1997. — Vol. 71. — P. 15–21.
17. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridization / Barlow R. E. [et al.] // J. Med. Microbiol. — 2001. — Vol. 50, N 10. — P. 902–908.

18. The role of heat shock proteins in reproduction / Neuer A. [et al.] // Hum. Reprod. Update. — 2000. — Vol., N. 6. — P. 149–159.

Статья представлена С. А. Сельковым,
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

IMMUNOMORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF ENDOMETRIUM ON CHRONIC CHLAMYDIAL SALPINGO-OOPHORITIS

Ellinidi A. N., Kostjuchek D. F., Drygina L. B.,
Mihnina E. A., Ellinidi V. N.

■ **Summary:** Histological and immunohistochemical investigation of endometrial scraping obtained on endometrial hysteroscopy in 58 women (average age of 30.5 ± 3.8 years) with chronic salpingo-oophoritis and abnormality of reproductive function was carried out in order to estimate morphofunctional state of endometrium. Determination of CD20, CD56, CD16, HLA-DR indices of local immunity in endometrium was carried out with immunohistochemical Envision method using monoclonal antibodies (DAKO). The ELISA technique was used to determine in women's blood serum two types of IgG

to heat shock protein, HSP60, and to major outer membrane protein, MOMP, as well as to plasmid protein pgp3 of *Chlamydia trachomatis* with the use of test systems of VectorBest (Russia). Results of the investigation showed that *Chlamydia trachomatis* antibodies (AX) HSP60 and MOMP\pgp3 were found in blood serum of 45 (77.6%) of 58 women, which confirmed the chlamydial etiology of chronic salpingo-oophoritis in those women.

Two groups were singled out in the samples of blood serum depending on the found titer of AX HSP60 and MOMP\pgp3 antibodies. The first group included 26 (57.8%) women with chronic salpingo-oophoritis of chlamydial etiology, in whose blood serum both types of antibodies (HSP60 and MOMP\pgp3) were determined. The second group included 19 (42.2%) women, in whose blood serum only AX MOMP\pgp3 were determined. Chronic endometritis (CE) was diagnosed on histological and immunohistochemical investigation of endometrium in 28 (62.2%) of 45 women. Thus, the results obtained show that chronic chlamydial salpingo-oophoritis in every other woman is associated with chronic endometritis and proceeds with various immune response. Further investigation of the state of immune system, its cellular and humoral components, and the indices of nonspecific resistance will enable us to develop and improve the efficiency of therapy aimed at the preservation of woman's reproductive health.

■ **Key words:** a chronic salpingo-oophoritis; chronic endometritis; chlamydial Hsp60 and MOMP/pgp3 antigen specific antibodies.

■ Адреса авторов для переписки

Эллиниди Анжелика Николаевна — аспирант кафедры акушерства и гинекологии.

СПГМА им. И. И. Мечникова.

195067, г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

E-mail: mechnik@gmail.com.

Костючек Дина Федоровна — д. м. н., заведующая кафедрой акушерства и гинекологии.

СПГМА им. И. И. Мечникова.

195067, г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

E-mail: mechnik@gmail.com.

Дрыгина Лариса Борисовна — д. б. н., старший научный сотрудник, начальник НИЛ иммуноферментного анализа.

ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России.

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

E-mail: medicine@arcerm.spb.ru.

Михнина Елена Андреевна — д. м. н., врач-гинеколог.

НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: iagmail@ott.ru.

Эллиниди Вера Николаевна — к. м. н., старший научный сотрудник, начальник лаборатории морфологических исследований.

ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России.

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

E-mail: medicine@arcerm.spb.ru.

Ellinidi Anzhelika Nikolaevna —

The Mechnikov Saint-Petersburg State Medical Academy.

195067 Russia, St.-Petersburg, Piskarevsky pr., 47

E-mail: mechnik@gmail.com.

Kostjuchek Dina Fedorovna —

The Mechnikov Saint-Petersburg State Medical Academy.

195067 Russia, St.-Petersburg, Piskarevsky pr., 47

E-mail: mechnik@gmail.com.

Drygina Larisa Borisovna —

The Federal State Institute of Public Health «Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine» EMERCOM of Russia.

194044 Russia, St.-Petersburg, St. of Acad. Lebedeva, 4/2.

E-mail: medicine@arcerm.spb.ru.

Mihnina Elena Andreevna —

D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS.

199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.

E-mail: iagmail@ott.ru.

Ellinidi Vera Nikolaevna —

The Federal State Institute of Public Health «Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine» EMERCOM of Russia.

194044 Russia, St.-Petersburg, St. of Acad. Lebedeva, 4/2.

E-mail: medicine@arcerm.spb.ru.