

КОЛМЫК

Вера Александровна

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО
ЭНДОМЕТРИТА У ЖЕНЩИН С ОТЯГОЩЕННЫМ АКУШЕРСКО-
ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИМ АНАМНЕЗОМ

14.03.02 — патологическая анатомия

14.01.01 — акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Насыров Руслан Абдуллаевич**.

доктор медицинских наук, профессор **Кутушева Галия Феттяховна**

Официальные оппоненты:

КВЕТНОЙ Игорь Моисеевич, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О. Отта», руководитель отдела патоморфологии;

КАХИАНИ Екатерина Инвериевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии им. С.Д. Давыдова.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 23 декабря 2019 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.02 на базе ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» МО РФ (194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ.

Автореферат разослан « ____ » 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Чирский Вадим Семенович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Большое внимание в последнее десятилетие приковано к проблеме хронического эндометрита (ХЭ) (Радзинский В. Е., 2013; Сухих Г. Т., 2013). По данным зарубежных и отечественных авторов, частота ХЭ широко варьирует от 3 до 73% (Дубницкая Л. В., 2007; Радзинский В. Э., 2009; Сидельникова В. М., 2002; Сухих Г. Т., 2013; Detection of chronic endometritis ... , 2005; Sharkey A. M., 2003). Важность данной нозологии заключается в том, что большую часть (до 97,6%) составляют женщины фертильного возраста, и этот факт подчеркивает особую значимость ХЭ с точки зрения влияния на возможности деторождения (Влияние инфекции ... , 2004; Сухих Г. Т., 2013; Молекулярные и морфологические аспекты ... , 2012). В большинстве случаев ХЭ протекает латентно и не имеет клинических проявлений инфекции (Шуршалина А. В., 2011; Майскова И. Ю., 2008). Сложности диагностики ХЭ связаны с необходимостью морфологического подтверждения диагноза (Морфологические особенности ... , 2001; Хмельницкий О. К., 1994, 2000). Следует отметить, что в литературе данные о роли вирусных агентов в этиологии ХЭ фрагментарны, так же фрагментарно представлены данные о характере морфологических изменений при верифицированной вирусной инфекции. Важным представляется вопрос применения расширенного иммуногистохимического (ИГХ) исследования по определению параметров местного иммунитета, выявления антигенов вирусов, экспрессии рецепторов к прогестерону (PR) и эстрогену (ER) в диагностике ХЭ. В настоящее время большое внимание уделяется использованию хромато-масс-спектрометрии (ХМСМ) в исследовании ХЭ. Отсутствие обобщенных представлений об этиологии и характере морфологических изменений при данной нозологии затрудняет разработку патогенетически обоснованной тактики восстановления репродуктивной функции у пациенток с ХЭ.

Степень разработанности темы исследования

В качестве методологической и теоретической основы диссертационного исследования использовались труды отечественных и зарубежных ученых, посвященные проблеме диагностики и лечения хронического эндометрита (Алимова О. А., 2011; Ахметов Х. Б., 2012; Патогенетические особенности макротипов ... , 2017; Радзинский В. Е. 2009, 2013; Шуршалина А. В., 2007; Prevalence of chronic endometritis ... , 2015). По мнению ряда авторов, на сегодняшний день большое количество ХЭ протекает с отсутствием классических гистологических признаков (Бессмертная В. С., 2008; Гистологическое исследование эндометрия ... , 2009; Коган Е. А., 2012; Морфологические особенности хронического эндометрита, 2001; Морфофункциональная характеристика рецептивности ... , 2013; Хмельницкий О. К., 1994). Это связано с широким применением антибактериальных препаратов в повседневной практике врачей (Кондриков Н. И., 2008; Толибова Г. Х., 2015). В современной литературе встречаются данные, указывающие на вероятную взаимосвязь гиперплазии эндометрия и наличия вирусной инфекции, однако эти данные единичны и требуют дальнейшего уточнения (Хронический эндометрит ... , 2015; Comprehensive endometrial immunoglobulin ... , 2014). В исследованиях, проведенных за последние 10 лет, показано, что, несмотря на применение современных диагностических методов, у пациенток с ХЭ в одной трети случаев выявляются стерильный посевы эндометрия, и это еще раз подчеркивает значимость вирусной инфекции в этиологии ХЭ (Патогенетические особенности макротипов ... , 2017; Морфофункциональная характеристика эндометрия ... , 2011; Гомболевская Н. А., 2016; Петров Ю. А., 2016; Хронический эндометрит ... , 2015). Особое внимание при верификации ХЭ уделяется иммуногистохимическому исследованию эндометрия (Immunohistochemical characterization ... , 2004; Kitaya K., 2011, 2013; Placental Hofbauer cells ... , 2011; Poor reliability of vaginal ... , 2009; The production of vascular endothelial growth factor ... , 2009; Limitation of the criteria ... , 2011). ИГХ является высокоспецифичным и высокочувствительным методом и позволяет не только

верифицировать этиологию, но и судить о морфогенезе инфекционного процесса (Роль вирусных инфекций ... , 2011), что существенно влияет на выбор тактики лечения с целью восстановления репродуктивной функции пациенток. Тем не менее в современной литературе отсутствуют данные о верификации вирусного поражения эндометрия с использованием данной методики. Существует необходимость дальнейшего изучения характера гистологических изменений при ХЭ, что несомненно влияет на частоту выявления данной нозологии (Петров Ю. А., 2013; Хмельницкий О. К., 2000; Эллиниди В. Н., 2002). Отсутствуют четкие единые алгоритмы по восстановлению репродуктивной функции и предгравидарной подготовке женщин, основанные на особенностях этиопатогенеза ХЭ (Трубно-перитонеальное бесплодие ... , 1999; Унанян А. Л., 2012). Отсутствуют данные о роли вирусной инфекции, как этиологического фактора ХЭ. Все вышеперечисленные факты и доводы определили цель данной работы.

Цель исследования

Изучить клинико-морфологические и иммуногистохимические проявления хронического эндометрита с целью разработки тактики восстановления репродуктивной функции у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

Задачи исследования

1. Уточнить клинико-анамнестические особенности нарушений репродуктивной функции пациенток с ХЭ.

2. Оценить состояние эндометрия по данным гистологического и иммуногистохимического исследований у женщин при ХЭ с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

3. Изучить экспрессию в эндометрии маркеров плазмоцитов (CD138), маркеров местного иммунитета (CD56, CD16, HLA-DR (II)), рецепторов к эстрогену и прогестерону при ХЭ.

4. Провести ИГХ-исследование эндометрия на определение антигенов вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) при хроническом эндометрите.

5. Сравнить результаты хромато-масс-спектрометрии и иммуногистохимического исследования при определении этиологического фактора ХЭ у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

6. Оценить эффективность разработанной тактики восстановления репродуктивного статуса при ХЭ у пациенток с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

Научная новизна

Впервые проведена сравнительная оценка результатов гистологического, расширенного иммуногистохимического и клинико-лабораторных исследований хронического эндометрита у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

Впервые выявлена частота экспрессии антигенов ВПГ, ЦМВ, вируса Эпштейна–Барр в эндометрии у пациенток с данной патологией.

Определен характер морфологических изменений при эндометрите у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом. Выявлена взаимосвязь этих изменений с экспрессией антигенов вирусов и маркеров местного иммунитета.

Разработан способ диагностики вирусной инфекции при эндометрите (патент на изобретение № 2657436).

Впервые при диагностике вирусной инфекции у пациенток с ХЭ проведено сопоставление результатов ИГХ-исследования и ХМСМ-анализа.

По совокупности результатов гистологического, ИГХ и клинико-лабораторного исследований предложена тактика восстановления репродуктивной функции у женщин с отягощенным анамнезом.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные исследования расширяют представления о патогенезе повреждения эндометрия у женщин с ХЭ, которые могут быть использованы в клинической практике при проведении клинико-морфологических сопоставлений. Разработанный в ходе проведенного исследования способ диагностики вирусной инфекции при эндометрите может быть использован как для выявления вирусного антигена, так и для изучения морфогенеза данной патологии, что, в свою очередь, важно при выборе тактики лечения. Полученные результаты позволяют более детально определить характер морфологических и ИГХ-проявлений хронического эндометрита у пациенток с верифицированной вирусной инфекцией. Данные исследования определили новые подходы к мероприятиям, обеспечивающим сохранение и восстановление репродуктивного статуса женщин с ХЭ.

Методология и методы исследования

В проведенном исследовании использовались следующие методы: клинический, гистологический, иммуногистохимический, масс-спектрометрический, микробиологический, молекулярно-генетический (полимеразной цепной реакции, ПЦР) и статистический. На проведение работы получено разрешение независимого этического комитета ФГБОУ ВО СПбГПМУ МЗ РФ. Клинические исследования проводились в соответствии с требованиями статьи № 20 Федерального закона № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и приказа Минздравсоцразвития РФ от 23.04.2012 № 390н после информированного добровольного согласия пациента на проведение медицинских вмешательств, а также согласия на обработку необходимых персональных данных в объеме и способами, указанными в п. 1, 3 ст. 3, ст. 11 Федерального закона № 152-ФЗ «О персональных данных».

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациенток с верифицированным хроническим эндометритом, основным клиническим проявлением которого является невынашивание беременности,

в эндометрии определяется экспрессия антигенов ВПГ, ЦМВ, вируса Эпштейна–Барр (43,5% в группе I и в 58% в группе II).

2. Наличие вирусной инфекции по данным гистологического исследования, как правило, сопровождается отеком стромы (56,5% в группе I и 70% в группе II), воспалительной инфильтрацией стромы (62,2% в группе I и 78,6% в группе II), фиброзом стромы (30,4% в группе I и 33,3% в группе II).

3. Наличие воспалительной инфильтрации, фиброза стромы и отека стромы сочетается с диагностически значимой экспрессией маркера естественных киллеров (CD16⁺) в 47% случаев у пациенток группы I и в 69% случаев в группе II и диагностически значимой экспрессией маркера плазматических клеток (CD138) во всех случаях.

4. Для диагностики вирусной инфекции и с целью проведения патогенетического лечения ХЭ и восстановления репродуктивной функции у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом необходимо использовать ИГХ- и ХМСМ-методы в сочетании с клинико-лабораторными и гистологическим исследованиями.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется достаточной по объему выборкой и применением современных методов диагностики. И использованные методы статистического анализа полученных результатов соответствуют поставленным задачам. Сформулированные на основании проведенной работы положения и рекомендации аргументированы и вытекают из результатов выполненных разноплановых исследований. Материалы диссертационного исследования доложены на II Научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные знания как основа клинической неонатологии и педиатрии» (Санкт-Петербург, 2015 г.), XIII научно-практической конференции «Амбулаторная акушерско-гинекологическая помощь от рождения до старости» (Санкт-Петербург, 2018 г.). Апробация работы

проведена на совместном заседании кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины и кафедры акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детского возраста ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 20 декабря 2018 г.

Внедрение в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую работу врачей СПбГБУЗ «Женская консультация № 22», кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинского университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертационного исследования применяются в учебном процессе при подготовке слушателей на кафедре акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детского возраста ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинского университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. По результатам проведенного исследования разработан и запатентован способ диагностики вирусной инфекции при эндометрите (патент на изобретение № 2657436).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций.

Личный вклад автора

Автором проведен аналитический обзор зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме и разработан дизайн исследования. Морфологическое и ИГХ-исследования проводились лично автором. Анализ историй болезни и другой медицинской документации, а также интерпретация

полученных данных морфологического и ИГХ-исследований выполнены автором самостоятельно.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, 7 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 27 рисунками. Библиография включает 245 источников, из которых 158 — отечественных авторов и 87 — иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

На базе СПбГБУЗ «Женская консультация № 22» и на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации было обследовано 86 женщин репродуктивного возраста вне беременности в возрасте от 18 до 35 лет.

Все пациентки, вошедшие в исследование на основании критериев включения/исключения, были разделены на три группы: I группа — 23 женщины с искусственными абортами по желанию в анамнезе (медикаментозные и хирургические), II группа — 43 женщины с самопроизвольными абортами (невынашивание, неразвивающаяся беременность). Группу контроля составили 20 женщин без репродуктивных потерь в анамнезе (группа III). Отбор пациенток происходил методом простой случайной (не вероятностной) выборки по мере обращения на консультативный прием.

Обследование пациенток включало:

- 1) клиническое обследование — анамнестическое и объективное;
- 2) ультразвуковое исследование органов малого таза (на 5–7-й день менструального цикла);
- 3) микробиологическое исследование — обследование инфекционного статуса пациенток (бактериоскопическое исследование материала из влагалища, цервикального канала и уретры; обследование на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР); проведение хромато-масс-спектрометрии биоптата эндометрия);
- 4) морфологическое исследование — гистологическое исследование аспиратов из полости матки, взятых на 7–10-й день менструального цикла при помощи кюретки Pipelle de Cornier;
- 5) иммуногистохимическое исследование аспиратов из полости матки — наличие антигенов ВПГ, ЦМВ, ВЭБ; показатели (экспрессия маркеров) местного иммунитета — CD56⁺, CD16⁺ и HLA-DR⁺, экспрессия маркера плазматических клеток (CD138), экспрессия рецепторов к ER и PR.

Микроскопическое исследование и фотографирование микропрепаратов осуществляли при помощи светового микроскопа Zeiss с объективами 20×, 40×, 100×, окулярами 10 с цифровой фотокамерой AxioCam MRc5 (Германия).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования проводились на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. Во всех наблюдениях биопсийный материал подвергался стандартной проводке с последующей парафиновой заливкой. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином.

ИГХ-исследование проводилось на парафиновых срезах по схемам, рекомендуемым фирмами-производителями. В работе использовали моноклональные антитела к антигенам вируса Эпштейна–Барр (производство Novocastra), моноклональные антитела к антигенам ЦМВ (производство

Novocastra), поликлональные антитела к антигенам ВПГ I и II типов (производство Dako), моноклональные антитела к рецепторам эстрогена (производство Leica), моноклональные антитела к рецепторам прогестерона (производство Novocastra), моноклональные антитела к CD56⁺ — маркера NK-клеток (производство Novocastra), моноклональные антитела к CD16⁺ — маркера NK-клеток (производство Novocastra), моноклональные антитела к HLA-DR (производство Novocastra), моноклональные антитела к CD138 — маркера плазматических клеток (производство Dako).

Интенсивность ИГХ-реакции к эстрогену и к прогестерону в ядрах клеток эпителия желез и стромы оценивали по методике гистологического счета H-score по формуле:

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

где a — доля слабо окрашенных ядер клеток, %; b — доля умеренно окрашенных ядер клеток, %; c — доля сильно окрашенных ядер клеток, %.

Степень выраженности экспрессии к эстрогену и прогестерону расценивали так: 0–10 баллов — отсутствие экспрессии, 11–100 баллов — слабая экспрессия, 101–200 баллов — умеренная экспрессия, 201–300 баллов — выраженная экспрессия.

Интенсивность реакции антигенов ВПГ, ЦМВ, ВЭБ 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 на всей площади среза, при увеличении объектива 40×.

Для оценки параметров местного иммунитета (CD56⁺, CD16⁺ и HLA-DR) парафиновые срезы после ИГХ-окраски просматривали в световом микроскопе в трех полях зрения при увеличении микроскопа 400. Подсчитывали количество положительно окрашенных клеток (экспрессирующих изучаемые маркеры) в каждом поле зрения. В случае незначительного разброса количественных показателей в разных полях зрения определяли среднее арифметическое. Оценку

результатов проводили в соответствии с рекомендациями В. Н. Эллиниди и соавт. (2002, 2003). Наличие экспрессии CD138 (маркер плазматических клеток) в эндометрии позволяло с большей вероятностью диагностировать ХЭ. В работе выполнялась оценка микробиоценоза эндометрия методом ХМСМ. Оценку результатов проводили в соответствии с рекомендациями Г. А. Осипова (патент на изобретение № 2086642).

Аспират из полости матки для проведения контрольного гистологического исследования получали путем пайпель-биопсии эндометрия в асептических условиях и при письменном согласии женщины в амбулаторных условиях через 1 мес после окончания лечения. Для исключения ошибочных морфологических заключений биопсия с помощью аспирационной кюретки Pipelle de Cornier эндометрия с целью верификации ХЭ проводилась только на 7–10-й день менструального цикла, то есть в среднюю и позднюю фазы пролиферации эндометрия.

Математико-статистическая обработка данных исследования осуществлена с помощью табличного редактора Microsoft Excel, в частности его модулей «Анализ данных» и «Мастер диаграмм», и пакета программ по статистической обработке данных Statistica for Windows. Математико-статистическое описание объекта исследования осуществлялось с помощью традиционных и давно утвердившихся в медицинских исследованиях методов: расчет средних значений показателей (среднего арифметического значения, моды, медианы); определение характеристик разброса признаков (дисперсии, среднего квадратического отклонения, размаха значений, квартильных оценок); вычисление стандартных ошибок средних значений и относительных частот, а также их доверительных интервалов; частотная и структурная характеристики показателей; графическое представление результатов. Оценка значимости различия средних значений и частоты проявления признаков в различных группах больных проводилась с помощью таких параметрических и непараметрических методов оценки гипотез, как параметрический t-критерий Стьюдента, непараметрический критерий χ^2

Пирсона, изучение связей между признаками с помощью параметрического коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст обследуемых пациенток составил $30 \pm 0,5$ лет в группе I, $31 \pm 0,3$ года в группе II и $30 \pm 0,5$ лет в группе III.

Анализ жалоб, предъявляемых при обращении, выявил, что самой частой причиной обращения пациенток I группы была дисменорея — 7 случаев (30,4%). Межменструальные кровянистые выделения и бесплодие стали поводом для явки в женскую консультацию у 3 пациенток (13%), скудные менструации беспокоили 2 пациенток (8,6%). У пациенток II группы наиболее частой причиной обращения было невынашивание беременности — 23 человека (53,4%). На втором месте — дисменорея, 10 случаев (23,6%). Межменструальные маточные кровотечения, бесплодие и скудные менструации стали причиной обращения 4 пациенток (9%).

Сексуальный дебют до 18 лет состоялся в группе I у 14 пациенток (60%), в группе II — у 25 пациенток (54%), в группе III — у 6 пациенток (30%). При этом средний возраст начала половой жизни в группе I составил $17,0 \pm 0,36$ лет, в группе II — $17,0 \pm 0,5$ лет, в группе III — $20 \pm 0,66$ лет.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) проводилось всем пациенткам на 5–7-й день менструального цикла. Данные УЗИ представлены в таблице 1.

Согласно полученным данным, расширение полости матки было диагностировано у 1 пациентки (4,4%) группы I и у 5 пациенток (11,6%) группы II. У пациенток группы III расширение полости матки не диагностировано. Неоднородность эхоструктуры эндометрия статистически достоверно чаще встречалась у пациенток группы I (17,4%) и пациенток группы II (18,6%) ($p < 0,05$). Увеличение переднезаднего размера наблюдалось у 1 пациентки (4,4%) группы I, у 3 пациенток (7%) группы II и не наблюдалось

Таблица 1 — Результаты ультразвукового исследования

Группа	Количество пациенток		Расширение полости матки	Неоднородность эхоструктуры эндометрия	Увеличение переднезаднего размера тела матки	Неравномерность толщины эндометрия
I	23	Абс.	1	4*	1	7
		%	4,4	17,4	4,4	30,4*
II	43	Абс.	5	8*	3	9
		%	11,6	18,6	7	21
III	20	Абс.	—	—	—	—
		%	—	—	—	—

* — $p < 0,05$ при сравнении с группой III.

у пациенток группы III. Неравномерность толщины эндометрия было у 7 пациенток (30,4%) группы I, 9 пациенток (21%) группы II. У пациенток группы III неравномерность толщины эндометрия обнаружена не была ($p < 0,05$).

Согласно дизайну исследования, гистологическое исследование эндометрия с последующим ИГХ-исследованием проводилось всем пациенткам на 7–10-й день менструального цикла, то есть в среднюю и позднюю фазы пролиферации.

В биоптатах эндометрия был выраженный отек стромы у 56,5% пациенток группы I и у 70% пациенток группы II ($p > 0,05$). Воспалительная инфильтрация стромы, представленная преимущественно лимфоцитами с включением макрофагов, эозинофилов и плазмоцитов, расположенных чаще вокруг желез и кровеносных сосудов, реже — диффузно, была у 69,5% пациенток группы I и у 78,6% пациенток группы II ($p > 0,05$). Фиброз стромы в виде плотной волокнистой соединительной ткани с сосудами со склерозированными стенками определялся у 30,4% пациенток группы I и 33,3% пациенток группы II ($p > 0,05$). Очаговая гиперплазия эндометрия статистически достоверно чаще встречалась у пациенток группы II (53,5%) по сравнению с пациентками группы I (13%) ($p < 0,05$). Обнаруживались железы округлой и слегка извитой формы, которые были

выстланы призматическим эпителием, в эпителиальной выстилке части желез определялись «штифтиковые клетки», «клетки-пузыри», встречались единичные структуры типа «железа в железе». Кистозное расширение желез (железы увеличены, деформированы и кистозно расширены) встречалось у 4,3% пациенток группы I и у 2,3% пациенток группы II ($p > 0,05$). Таким образом, у 17 пациенток (74%) группы I и у 33 пациенток (76,7%) группы II были выявлены морфологические признаки хронического эндометрита.

Согласно дизайну исследования, в обеих группах в эндометрии оценивались экспрессия маркеров естественных киллеров (CD56⁺, CD16⁺) и маркера активированных клеток (HLA-DR), маркера плазматических клеток (CD138). Было проведено исследование на выявление в эндометрии антигенов ВПГ, ЦМВ, ВЭБ, выраженность экспрессии рецепторов к ER и PR.

Параметры местного иммунитета представлены в таблице 2.

По результатам исследования маркёров местного иммунитета можно отметить, что у 47,8% пациенток группы I были выявлены лимфоциты, экспрессирующие в эндометрии маркер CD16⁺ (рисунок 1, а) в диагностически значимом количестве. При этом у 4 (17,4%) обнаружена значимая экспрессия

Таблица 2 — Параметры местного иммунитета

Группа	Количество пациенток		CD16 ⁺	CD56 ⁺	HLA-DR
I	23	Абс.	11	—	4
		%	47,8*	—	17,4
II	43	Абс.	30	1	12
		%	69,8*	2,3	27,9*
III	20	Абс.	—	—	—
		%	—	—	—

* — $p < 0,05$ при сравнении с группой III.

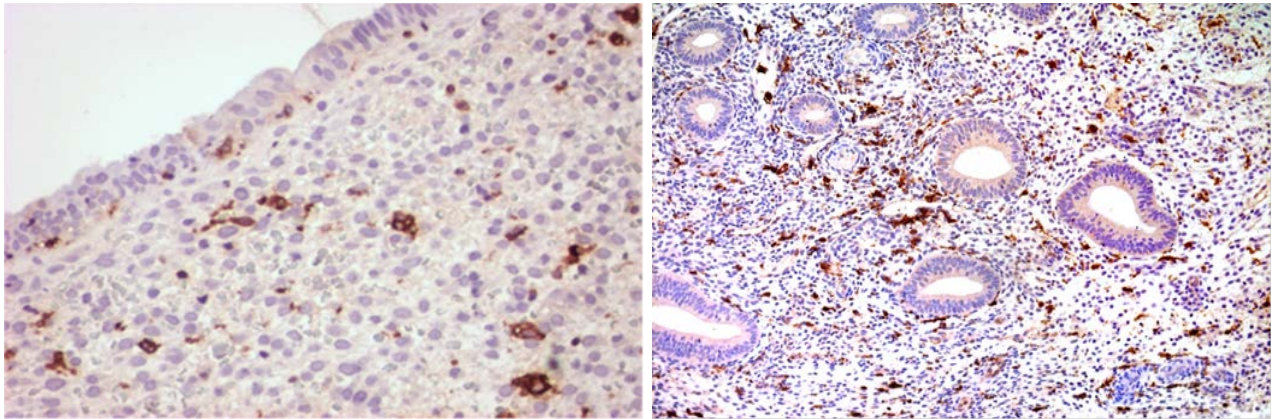
*а**б*

Рисунок 1 — Эндометрий средней стадии пролиферации:

а — экспрессия CD16⁺ у пациентки группы I (×400); *б* — экспрессия HLA-DR в эндометрии у пациентки группы I (×200). ИГХ

HLA-DR (рисунок 1, *б*), свидетельствующая об активации воспалительного процесса. У пациенток группы II диагностически значимая экспрессия CD16⁺ выявлялась чаще (69,8%), значимый уровень экспрессии HLA-DR выявлялся у 12 пациенток, что также может свидетельствовать о стадии активации воспалительного процесса.

Экспрессия маркера плазматических клеток (syndecan-1 — CD138) в эндометрии была выявлена у 65,2% пациенток ($n = 15$) группы I, 72,1% пациенток ($n = 31$) группы II и не была выявлена ни у одной пациентки группы III ($p < 0,05$).

Результаты ИГХ по определению антигенов ВПГ, ЦМВ, ВЭБ представлены на рисунке 2.

У пациенток группы I в 43,5% случаев ($n = 10$) в эндометрии была выявлена экспрессия антигенов вирусов. Обращает на себя внимание факт, что во всех случаях (43,5%) обнаруживались антигены ВПГ (рисунок 3, *а*), в 13% случаев ($n = 3$) были выявлены антигены ЦМВ (рисунок 3, *б*) и в 4,35% случаев ($n = 1$) ВЭБ. У пациенток группы II антигены вирусов выявлялись в 58,1% случаев ($n = 25$). При этом антигены ВПГ обнаруживались в 53,5% случаев ($n = 23$),

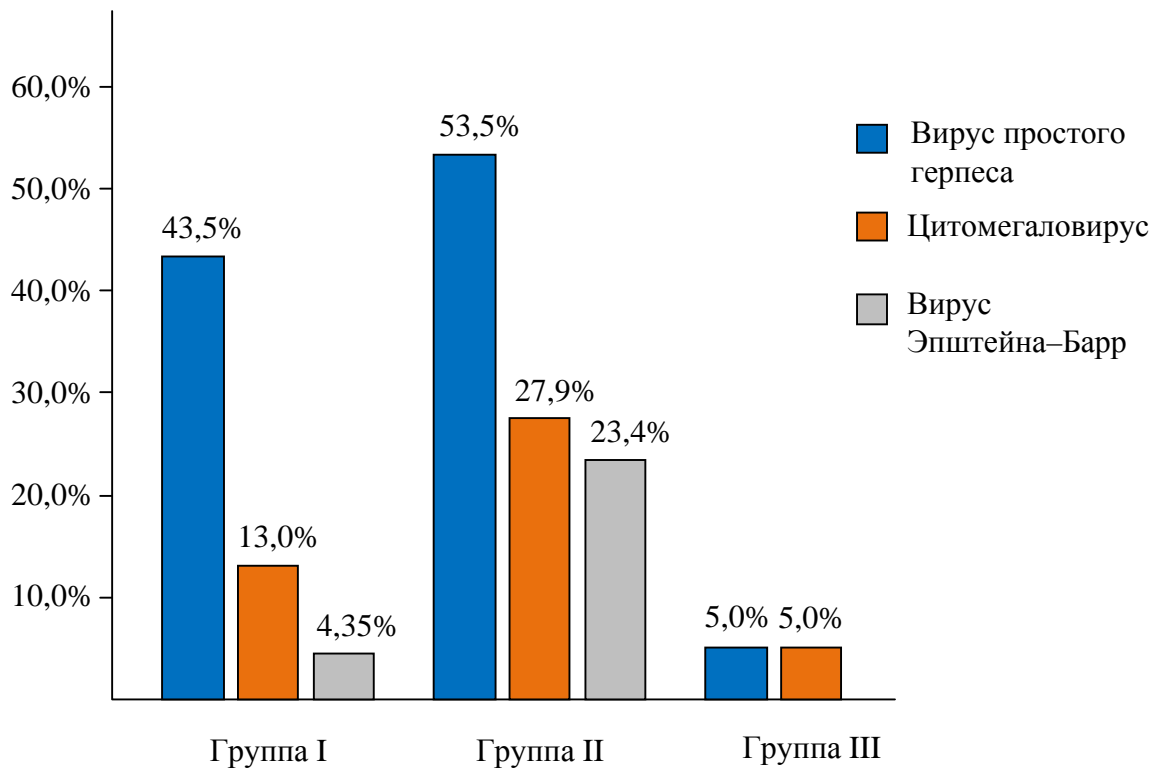
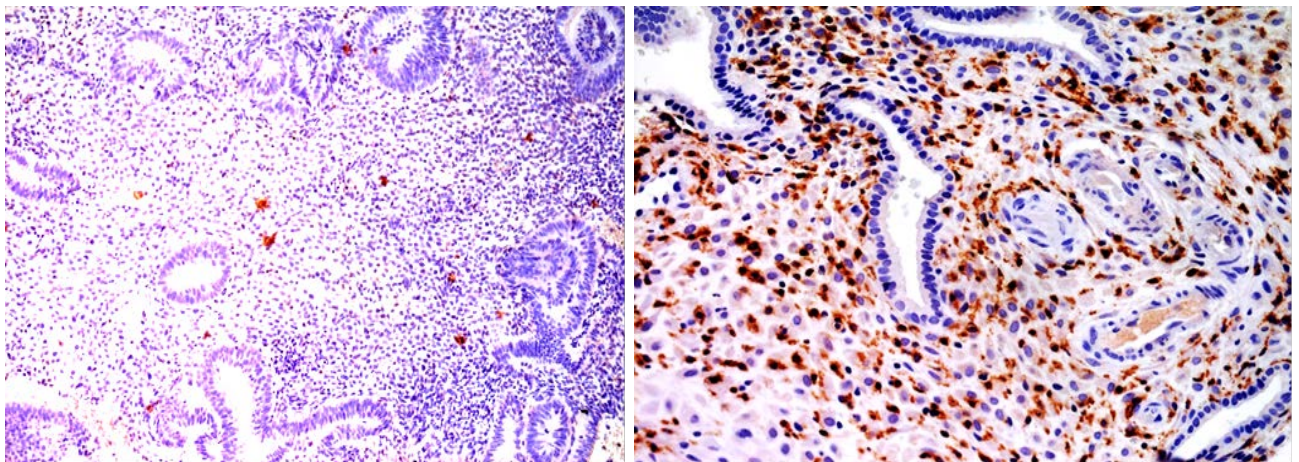


Рисунок 2 — Частота распределения антигена вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр в эндометрии у пациенток групп I, II, III



а

б

Рисунок 3 — Эндометрий средней стадии пролиферации:

а — экспрессия антигена вируса простого герпеса в строме эндометрия у пациентки группы I; *б* — экспрессия антигена цитомегаловируса в строме эндометрия у пациентки группы I.

×200, ИГХ

антигены ЦМВ выявлялись в 27,9% случаев ($n = 12$), антигены ВЭБ — в 23,3% случаев ($n = 10$). У пациенток группы III антигены ВПГ обнаруживался в 5% случаев ($n = 1$), антигены ЦМВ — в 5% случаев ($n = 1$). Таким образом, по данным ИГХ-исследования инфицированность эндометрия вирусами в I и II группах составила в целом 43,5 и 58,1% соответственно.

Согласно дизайну исследования, для идентификации патогенных микроорганизмов материал, полученный из полости матки, подвергался ХМСМ. Исследование было выполнено всем пациенткам групп I и II, 10 пациенткам группы III.

По результатам исследования у пациенток I группы (рисунок 4) в количестве, превышающем норму, были выявлены следующие микроорганизмы: у 13 пациенток (56,5%) — *Propionibacterium freundenreihii*, у 10 пациенток (43,5%) — *Streptococcus/Ruminococcus*, у 5 пациенток (21,7%) — *Clostridium Coccoides*, у 6 пациенток (26,1%) — *Streptococcus mutans*, у 13 пациенток (56,5%) — *Clostridium ramosum*. У пациенток II группы (рисунок 5) в количестве, превышающем норму, были выявлены следующие микроорганизмы: у 23 пациенток (53,5%) — *Propionibacterium freundenreihii*, у 10 пациенток (23,5%) — *Streptococcus/Ruminococcus*, у 5 пациенток (21,7%) — *Clostridium Coccoides*, у 6 пациенток (26,1%) — *Streptococcus mutans*, у 21 пациентки (48,8%) — *Clostridium ramosum*. В группе III *Streptococcus/Ruminococcus* обнаруживался у одной пациентки (10%). У пациенток группы I ВПГ выявлялся в 7 случаях (30,4%), у пациенток группы II — в 19 случаях (44,2%). Цитомегаловирус был у 2 пациенток (8,7%) группы I и у 7 пациенток (16,3%) группы II. ВЭБ был выявлен у 6 пациенток (14,6%) группы II (рисунок 6). Таким образом, у пациенток групп I и II условно-патогенные микроорганизмы в количестве, превышающем предельно допустимые значения, обнаруживались чаще по сравнению с пациентками группы III ($p < 0,05$). По данным ХМСМ, вирус простого герпеса, ЦМВ и ВЭБ в диагностически значимом количестве обнаружались только у пациенток групп I и II (см. рисунок 6).

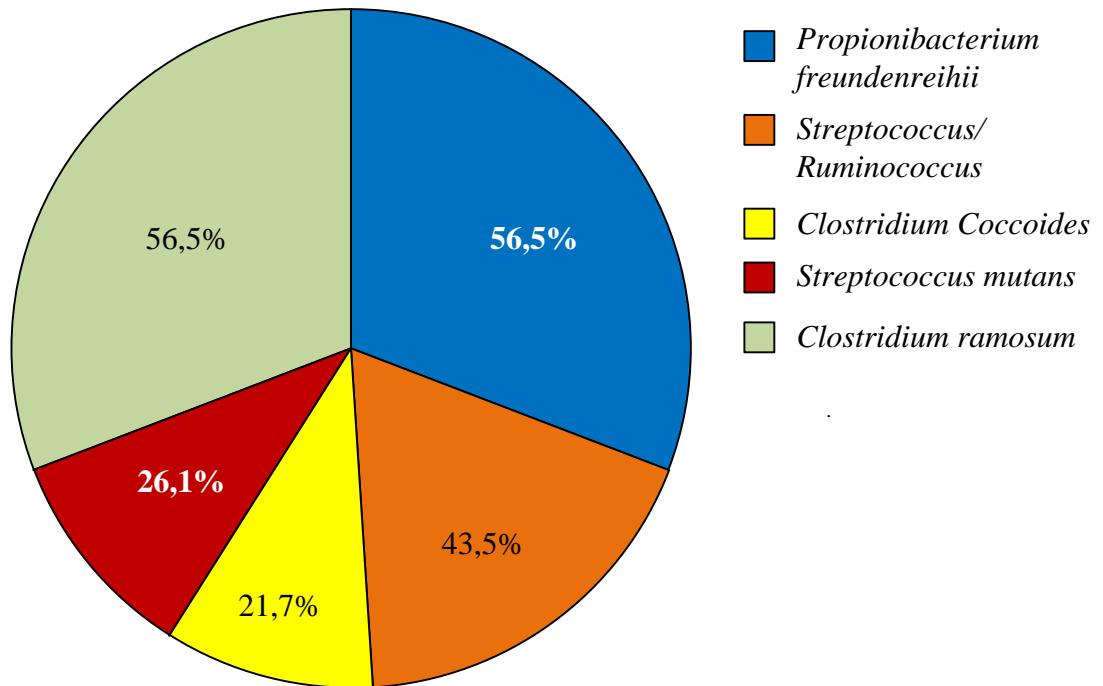


Рисунок 4 — Результаты хромато-масс-спектрометрии
(аспират из полости матки) у пациенток группы I ($n = 23$)

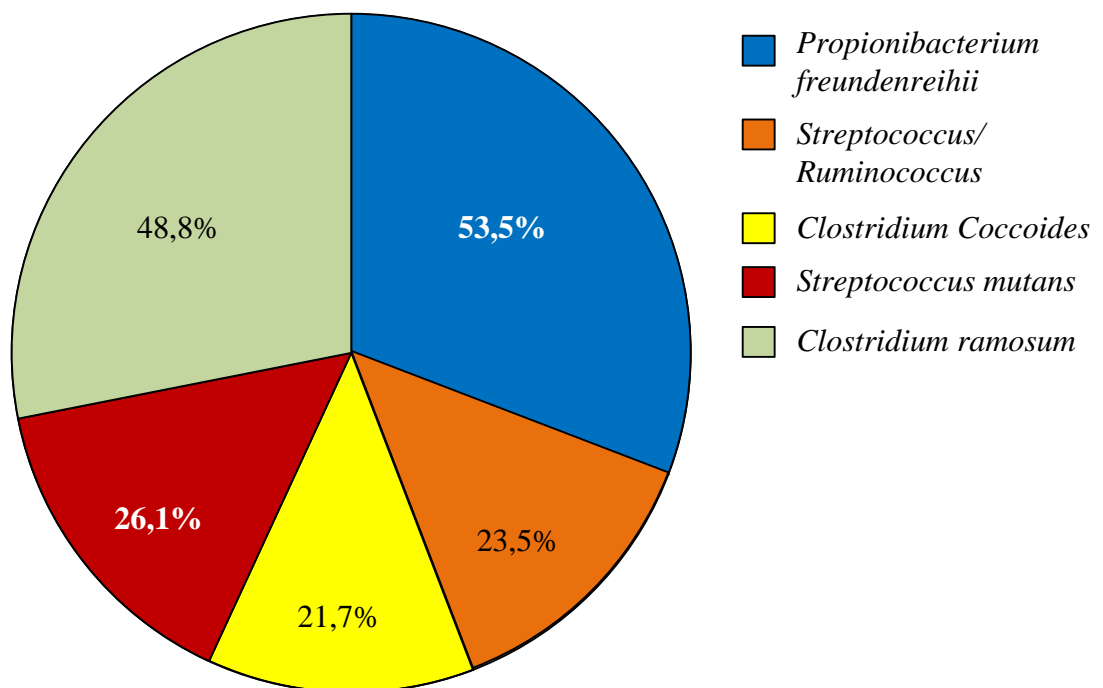


Рисунок 5 — Результаты хромато-масс-спектрометрии
(аспират из полости матки) у пациенток группы II ($n = 43$)

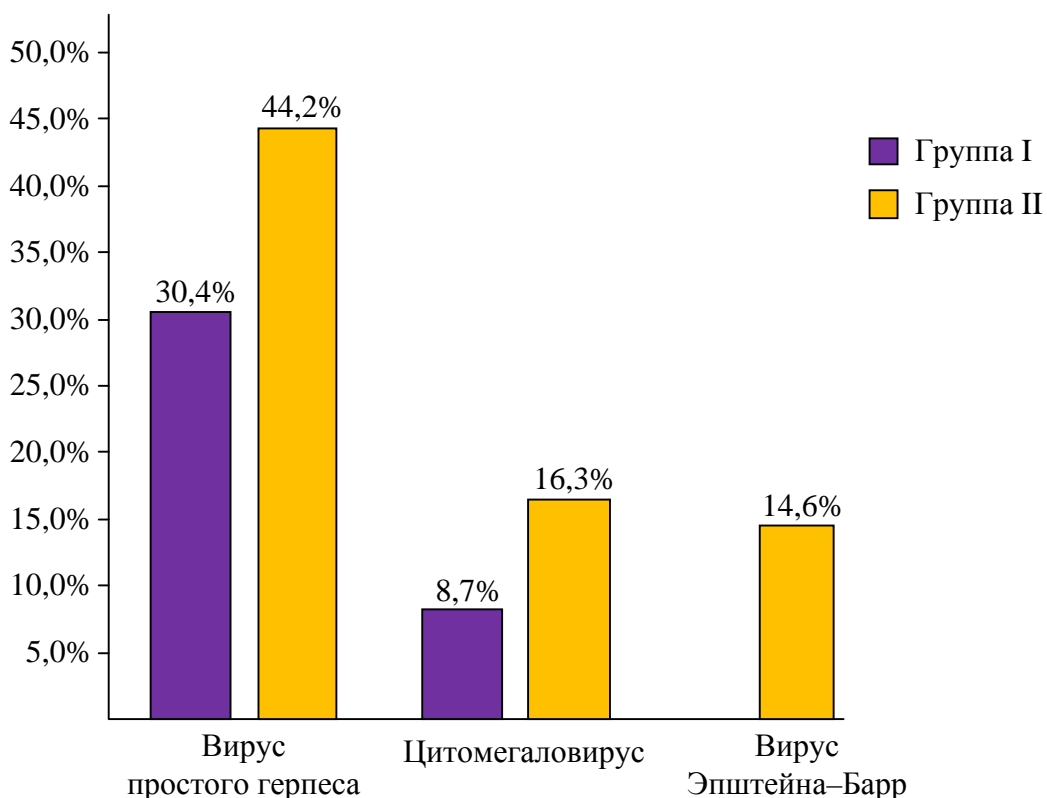


Рисунок 6 — Частота встречаемости вируса простого герпеса, цитомегаловируса и вируса Эпштейна–Барр по данным масс-спектрометрии у пациенток групп I и II

Результаты после проведенного лечения

При ведении пациенток, обратившихся с проблемами репродукции, в случае выявления ХЭ, мы руководствовались общепринятыми принципами лечения данной нозологии (Мальцева Л. И., 2012; Петров Ю. А., 2016; Тапильская Н. И., 2014). Пациенткам группы I и II при морфологически и иммуногистохимически М-диагностированном ХЭ с целью элиминации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов было проведено следующее лечение.

1. Курс антибактериальной терапии проводился при выявлении микробных патогенов (полусинтетический пенициллин) по 1000 мг 2 раза в день курсом 7 дней, после — джозамицин по 500 мг 3 раза в день курсом 10 дней.

2. Пациенткам, у которых по данным гистологического исследования были выявлены признаки ХЭ в виде сильно и умеренно выраженной воспалительной инфильтрации стромы, в ИГХ-исследовании и по данным масс-спектрометрии был выявлен ВПГ, ЦМВ и вирус Эпштейна–Барр, проводилась противовирусная терапия препаратом фамцикловир в дозе 500 мг 2 раза в день курсом 7 дней, далее по 250 мг 2 раза в день курсом 3 мес. Продолжительность супрессивной терапии была обусловлена желанием пациенток планировать беременность в ближайшие сроки.

3. Иммуномодулирующая терапия препаратом на основе полисахаридов побегов *Solanum tuberosum* курсом пять внутривенных инъекции. Препарат вводился по схеме: 5,0 мл внутривенно струйно троекратно с интервалом 48 ч и двукратно с интервалом 72 ч.

Второй этап лечения: физиотерапевтическое лечение (электрофорез с Zn и Cu по пять процедур).

После клинико-лабораторного обследования и проведенного лечения через 1 мес пациенткам групп I и II были выполнены контрольные исследования с целью оценки эффективности проведенного курса лечения. Учитывая, что морфологически и иммуногистохимически ХЭ был подтвержден у 17 пациенток группы I и 33 пациенток группы II, контрольные исследования проводились только им.

В группе I морфологические признаки ХЭ были выявлены после лечения у 3 пациенток (13%), до лечения — у 17 пациенток (74%) ($p < 0,05$). В группе II морфологические признаки ХЭ были после лечения у 6 пациенток (14%), до лечения — у 33 пациенток (76,7%) ($p < 0,05$).

Результаты исследования пациенток группы I представлены в таблице 3. Антигены ВПГ в эндометрии были выявлены после лечения у 2 пациенток (8,7%), до лечения — у 10 (43,5%). Антигены ЦМВ после лечения в эндометрии не были обнаружены ни у одной пациентки, до лечения — у 3 пациенток (13%). Антигены ВЭБ после лечения в эндометрии не были обнаружены ни у одной пациентки, до лечения — у 1 пациентки (4,4%).

Таблица 3 — Антигены вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр у пациенток группы I до и после лечения

		Вирус простого герпеса	Цитомегаловирус	Вирус Эпштейна–Барр
До лечения	Абс.	10	3	1
	%	43,5	13	4,4
После лечения	Абс.	2	—	—
	%	8,7*	—	—

* — $p < 0,05$.

У пациенток группы II (таблица 4) антигены ВПГ после лечения в эндометрии были обнаружены у 5 пациенток (11,6%), до лечения — у 23 (53,5%). Антигены цитомегаловируса в эндометрии после лечения не были обнаружены ни у одной пациентки, до лечения — у 12 пациенток (27,9%). Антивирусы ВЭБ после лечения не были обнаружены ни у одной пациентки, до лечения определялись у 10 пациенток (23,3%).

Таблица 4 — Антигены вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр у пациенток группы II до и после лечения

		Вирус простого герпеса	Цитомегаловирус	Вирус Эпштейна–Барр
До лечения	Абс.	23	12	10
	%	53,5	27,9	23,3
После лечения	Абс.	5	0	0
	%	11,6*	0*	0*

* — $p < 0,05$.

После проведенного исследования пациентки групп I и II находились под динамическим наблюдением в течении 1 года. Беременность наступила у 9 пациенток (39,1%) группы I с диагностированным ранее ХЭ и у 14 пациенток (32,6%) группы II. При этом в группе I у 4 пациенток беременность наступила через 2 мес после проведенного лечения, у 4 пациенток через 3 мес и у одной через 4 мес. В группе II у 2 пациенток беременность наступила через 1 мес после проведенного лечения, у 5 пациенток через 2 мес, у 5 пациенток через 3 мес, у 2 через 4 мес после проведенной терапии. У одной пациентки группы I в последствии была диагностирована неразвивающаяся беременность на сроке 4–5 недель. У 2 пациенток группы I и у 3 пациенток группы II беременность протекала на фоне угрожающего выкидыша на ранних сроках. У 2 пациенток группы I и у одной пациентки группы II беременность протекала на фоне выраженного токсикоза первой половины беременности. Такие осложнения беременности, как фетоплацентарная недостаточность, синдром задержки внутриутробного развития плода, зарегистрированы не были. У одной пациентки группы I и у 2 пациенток группы II были отеки беременных, у одной пациентки группы II впоследствии развилась преэклампсия легкой степени тяжести. У 8 пациенток группы I беременность закончилась срочными родами, из них у двух путем операции кесарева сечения. В группе II у 14 пациенток беременность закончилась срочными родами, из них у 3 путем операции кесарева сечения. Причиной родоразрешения путем операции кесарева сечения в группе I послужил рубец на матке. В группе II причиной родоразрешения путем операции кесарева сечения у одной пациентки послужила угрожающая гипоксия плода, у двух пациенток рубец на матке.

ВЫВОДЫ

1. Основным клиническим проявлением хронического эндометрита у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, имеющего характерные гистологические, иммуногистохимические и клинико-лабораторные проявления, является нарушение репродуктивной функции в виде невынашивания.

2. У пациенток с верифицированным хроническим эндометритом по данным иммуногистохимического исследования в эндометрии определяется экспрессия антигенов вирусов: простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр (43,5% в группе I и 58% в группе II).

3. Наличие воспалительной инфильтрации, фиброза и отека стромы при хроническом эндометрите сочетается с диагностически значимой экспрессией маркера естественных киллеров (CD16⁺) в 47% случаев у пациенток группы I и 69% случаев в группе II, с диагностически значимой экспрессией маркера плазматических клеток (CD138) — во всех случаях.

4. Гиперплазия эндометрия встречалась чаще у пациенток с верифицированной герпетической инфекцией. Данный признак сочетается с диагностически значимой экспрессией маркера естественных киллеров — CD16⁺ (47,8% в группе I и 69,8% в группе II), а также во всех случаях сочетается с диагностически значимой экспрессией маркера плазматических клеток — CD138.

5. Использование ИГХ- и ХМСМ-методов демонстрирует значимую сопоставимость результатов исследования ($p > 0,05$), что обеспечивает более высокую информативность и объективность в диагностике вирусной инфекции

6. Включение в комплекс восстановления репродуктивного статуса пациенток с ХЭ специальной схемы противовирусной терапии позволило достигнуть положительного результата в 33% в группе II и в 39% случаев в группе I.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Тактика восстановления репродуктивной функции у пациенток с хроническим эндометритом должна базироваться на совокупности гистологического и расширенного ИГХ-исследований с учетом данных клинико-лабораторного и ультразвукового исследований.

2. Для повышения эффективности диагностики и лечения хронического эндометрита целесообразно применение разработанного способа диагностики вирусной инфекции при эндометрите (патент на изобретение № 2657436).

3. Применение ИГХ-исследования по определению маркёров местного иммунитета (CD56⁺, CD16⁺ и HLA-DR) увеличивает возможность целенаправленного восстановления иммунного статуса.

4. Возможность использования ИГХ- и ХМСМ-методов обеспечивает высокую информативность в диагностике вирусной инфекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВПГ	— вирус простого герпеса
ВЭБ	— вирус Эпштейна–Барр
ИГХ	— иммуногистохимия
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
УЗИ	— ультразвуковое исследование
ХМСМ	— хромато-масс-спектрометрия
ХЭ	— хронический эндометрит
ЦМВ	— цитомегаловирус
CD16, CD56, CD138	— clusters of differentiation (кластеры дифференциации), субпопуляции лимфоцитов 16, 56, 138

HLA-DR (II)	— human leucocyte antigens (лейкоцитарные антигены человека II класса)
ER	— эстрогеновые рецепторы
PR	— прогестероновые рецепторы

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной
комиссией Российской Федерации

1. Значение иммуногистохимического контроля для лечения пациенток с хроническим эндометритом / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева, В. В. Петров // Педиатр. — 2016. — № 3 (7). — С. 17–22.

2. Колмык, В. А. Гистологическая и иммуногистохимическая верификация хронического эндометрита у пациенток с отягощенным акушерским анамнезом / В. А. Колмык, Г. Ф. Кутушева, Р. А. Насыров // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2017. — № 3 (23) — С. 29–32.

3. Колмык, В. А. Клинико-иммуногистохимические аспекты восстановления репродуктивной функции женщин с хроническим эндометритом / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева. // Журн. акушерства и женских болезней. — 2014. — Т. IXIII, № 4. — С. 34–38.

4. Колмык, В. А. Роль специфической иммуногистохимической методики в диагностике хронического эндометрита / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева // Вестн. Российской военно-мед. акад. — 2015. — № 1. — С. 34–37.

Другие научные публикации

1. Колмык, В. А. Возможности ИГХ исследований в персонализированном подходе лечения хронического эндометрита. III Всероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от предгравидарной подготовки к здоровому материнству и детству». — СПб., 2017. — С. 52.

2. Колмык, В. А. Восстановление репродуктивной функции женщин с хроническим эндометритом / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева // Проблемы развития высоких технологий : сб. статей. — 2015. — Т. 1. — С. 68–71.

3. Колмык, В. А. Преимущества иммуногистохимического метода в диагностике хронического эндометрита / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева // Педиатр. — 2015. — № 1 (6) — С. 11–16.

4. Колмык, В. А. Роль вирусной инфекции как этиологического фактора хронического эндометрита. Конгресс с международным участием «Здоровые дети-будущее страны». — СПб., 2017. — С. 157.

5. Колмык, В. А. Сравнительный анализ иммуногистохимического и хромато-масс-спектрометрического исследований в диагностике этиологического фактора хронического эндометрита / В. А. Колмык, Р. А. Насыров, Г. Ф. Кутушева // Сб. трудов третьего национального конгресса с международным участием «Здоровые дети — будущее страны». — С. 267–268.

6. Колмык, В. А. Хронический эндометрит и репродуктивное здоровье женщины. II конференция молодых ученых «фундаментальные знания как основа клинической неонатологии и педиатрии». — СПб., 2015 — С. 98–99.

Патент на изобретение

Способ диагностики вирусной инфекции при эндометрите: пат. 2657436 Рос. Федерация / Насыров Р. А., Кутушева Г. Ф., Колмык В. А. ; патентообладатель ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России.