

И.А. Храмова, И.П. Кольцов

СЕКРЕТОРНО-СИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ БЕСПЛОДИИ У ЖЕНЩИН

*Владивостокский государственный медицинский университет¹,
690950, пр. Острякова, 2, г. Владивосток;*

*Дальневосточный государственный медицинский университет²,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск*

Резюме

Исследованы секреторно-синтетическая активность моноцитов крови и перитонеальных макрофагов, состояние стабильности лизосомных мембран и уровень секреции ИЛ-8 моноцитами крови у 10 здоровых фертильных женщин, 18 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и 8 женщин с бесплодием неясного генеза. Выявлено, что при трубно-перитонеальном бесплодии у женщин происходит повышение уровня секреции ИЛ-8 моноцитами крови, лабилизация лизосомных мембран моноцитов/макрофагов, повышение секреции и незначительное снижение синтеза лизоцима этими клетками. При бесплодии неясного генеза имеет место стабилизация лизосомных мембран, снижение секреции и синтеза лизоцима моноцитами крови и перитонеальными макрофагами. Уровень секреции ИЛ-8 моноцитами крови у женщин с бесплодием неясного генеза практически не отличается от уровня здоровых фертильных женщин.

Ключевые слова: лизоцим, интерлейкин-8, бесплодие.

L.A. Khramova, I.P. Koltsov

SECRETORY AND SYNTHETIC ACTIVITY OF BLOOD MONOCYTES AND PERITONEAL MACROPHAGES IN INFERTILE WOMEN.

*Far East state medical university, Khabarovsk;
Vladivostok state medical university, Vladivostok*

Summary

The authors studied IL-8 secretion of blood monocytes, the condition of stability of lysosome membranes and secretory synthetic function of blood monocytes and peritoneal macrophages in 10 healthy fertile women, 18 women with tubal peritoneal infertility and 8 women with infertility of unclear genesis. The study revealed that in case of tubal peritoneal infertility IL-8 secretion by blood monocytes, labialization of monocyte's/macrophage's lysosome membranes, secretion and insignificant lapse of lyzosome fusion of the cells increased. In case of infertility of unclear genesis stabilization of the lyzosome membranes, decrease of secretion and lyzocyme fusion of blood monocytes and peritoneal macrophages occur. IL-8 secretion of blood monocytes in case of unclear infertility doesn't significantly differ from the healthy fertile women condition.

Key words: lysocyme, anionic neutrophil-activating peptide, infertility.

Одной из важнейших проблем нарушения репродуктивного здоровья женщины является бесплодие различного генеза. Наиболее распространенной формой женского бесплодия считается трубно-перитонеальное. Приблизительно у 50-60% женщин, страдающих бесплодием, наблюдается патология маточных труб. В последние годы возросло число женщин с бесплодием неясного генеза. Уровень необъяснимого бесплодия колеблется в довольно широких пределах — от 0,1 до 25%, что связано с методическими подходами при обследовании, технической оснащённостью клиники и лаборатории, квалификацией врачей [3]. В основе трубно-перитонеального бесплодия, как правило, лежит хроническое воспаление матки и придатков матки, при которых макрофаги играют существенную роль [1, 6]. Бесплодие неясного генеза развивается на фоне клинического благополучия при отсутствии заметных отклонений функциональных и лабораторных показателей, хотя не исключается латентное течение инфекции [5].

Активация клеток системы макрофагов — важный процесс их включения в биологические реакции организма: воспаление, иммунный ответ, процессы регенерации. При активации макрофагов возникает усиление синтетических, секреторных процессов в клетках, в частности, происходит повышение выхода лизосомных ферментов из клеток, усиление выработки интерлейкина-8, уровень которого в крови заметно повышается [8, 10]. Секреция лизосомных ферментов сопряжена с состоянием стабильности лизосомных мембран клеток: при лабилизации лизосомных мембран происходит повышение выхода ферментов, при стабилизации — снижение [7].

Целью нашего исследования явилось изучение состояния лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов через синтез, секрецию лизоцима и ИЛ-8 этими клетками при трубно-перитонеальном бесплодии и бесплодии неясного генеза.

Материалы и методы

Исследование проведено у 10 здоровых фертильных женщин, обратившихся к гинекологу за консультацией (1 группа), 18 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием (2 группа) и 8 женщин с бесплодием неясного генеза (3 группа). Больные находились на лечении в гинекологическом отделении городской больницы №1 г. Владивостока. Диагноз ставился на основании клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования с обязательным использованием лапароскопии.

Таблица 1

Таблица 2

Показатели стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов у фертильных женщин и женщин с бесплодием (M±m)

Группы сравнения	ПСЛМ, % моноцитов	ПСЛМ, % макрофагов	Уровень IL-8 пкг/мл 10 ⁶ кл
1 группа Фертильные женщины	52,8±1,4	57,9±1,5	118,0±25,0
2 группа Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием	58,5±1,2*	65,7±1,3**	1130,0±112,0
3 группа Женщины с бесплодием неясного генеза	45,3±1,9**	48,4±1,8**	128,0±30,0

Примечания. * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$ — достоверность различий между сравниваемыми группами.

Уровень секреции лизоцима (Лсекр.) моноцитами крови и перитонеальными макрофагами у фертильных женщин и женщин с бесплодием (M±m)

Группы сравнения	Лсекр. мкг/мл моноцитов	Лсекр. мкг/мл макрофагов	Уровень IL-8 пкг/мл 10 ⁶ кл
1 группа Фертильные женщины	0,7±0,02	0,89±0,018	118,0±25,0
2 группа Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием	0,78±0,015*	0,96±0,014*	1130,0±112,0
3 группа Женщины с бесплодием неясного генеза	0,60±0,01**	0,76±0,03**	128,0±30,0

Примечания. * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$ — достоверность различий между сравниваемыми группами.

Возраст женщин колебался от 25 до 36 лет ($30,5\pm2,5$ г.). Все исследования осуществлялась при информированном согласии женщин.

Выделение моноцитов крови проводилось на градиенте плотности фиколл-верографина центрифугированием крови в течение 30 мин при 400 G с последующим отсасыванием микропипеткой кольца градиента [7]. Клетки прикреплялись к поверхности стекла в течение 60 мин при температуре 37°. Перитонеальные макрофаги получали из суспензии, взятой методом пункций заднего влагалищного свода, так же выделяли прикреплением клеток к поверхности стекла. Концентрацию клеток считали в камере Горяева и доводили стерильным физиологическим раствором до 6×10^6 кл/мл. Определение стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов с расчетом показателя стабильности (ПСЛМ) осуществляли методом культивирования выделенных клеток в среде 199 с добавлением 0,5% стерильного глутамина и 2,5% смешанной человеческой сыворотки, прогретой в течение 30 мин при 56°C, в течение 12-15 ч при 37°. Микрометодом [2] проводили определение секретированного лизоцима (Лсекр.), а после 4-6-кратного замораживания-оттаивания культивируемых клеток — определение общего лизоцима (Лобщ. — секретированный плюс внутриклеточный). На основании полученных результатов секретированного и общего лизоцима определяли ПСЛМ по формуле: $ПСЛМ = Лсекр./Лобщ. \times 100\%$ [8]. Повышение показателя нами расценивалось как лабилизация лизосомных мембран, а снижение показателя — как стабилизация. Количество синтезированного лизоцима (Лсинт.) определяли по результатам оценки разницы (Лобщ.) до и после культивирования клеток.

Проведенные ранее нами исследования [8] выявили выраженные колебания ПСЛМ в зависимости от фазы менструального цикла. Поэтому обследование женщин проводилось во вторую фазу менструального цикла.

Определение уровня интерлейкина-8 в супернатанте культивированных клеток (интерлейкин-8 моноцитов крови) осуществляли методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «R&D Diagnostics Inc» (США). Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistica 6 с применением стандартных методов вариационной статистики и t-критерия Стьюдента для оценки различий при

парных изменениях показателей. Различие считалось достоверным при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было выявлено, что у здоровых фертильных женщин количество секретируемого IL-8 моноцитами крови колеблется от 80 до 130 пг/мл/10⁶ кл и в среднем составляет $118,0\pm25,0$ пг/мл/10⁶кл. У женщин с трубно-перитонеальным бесплодием происходит значительное возрастание уровня секреции IL-8, по сравнению со здоровыми фертильными женщинами ($p<0,01$), и составляет $1130,0\pm112,0$ пг/мл/10⁶ кл. При бесплодии неясного генеза количество IL-8 ($128,0\pm30,0$ пг/мл/10⁶ кл) незначительно превышает этот показатель здоровых фертильных женщин ($p>0,05$), что соответствует различной степени эндогенной активации клеток-продуцентов интерлейкина-8, в частности, моноцитов.

При этом состояние стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов, их секреторно-синтетическая активность при разном уровне секреции IL-8 моноцитами крови имели различия у здоровых фертильных женщин, женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и бесплодием неясного генеза. В табл. 1 представлены результаты исследования ПСЛМ моноцитов и макрофагов фертильных женщин и женщин с бесплодием.

Как видно из табл. 1, у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием наряду с повышением уровня IL-8 происходило выраженное увеличение ПСЛМ моноцитов крови и перитонеальных макрофагов по сравнению с аналогичными показателями у здоровых фертильных женщин ($p<0,05$ и $p<0,01$ соответственно), что свидетельствует, по-нашему мнению, о происходящей лабилизации лизосомных мембран этих клеток при данной патологии. У женщин с бесплодием неясного генеза при незначительном повышении содержания IL-8, напротив, наблюдалось снижение ПСЛМ моноцитов/макрофагов по отношению к здоровым женщинам, что указывает на стабилизацию лизосомных мембран клеток ($p<0,05$ и $p<0,01$ соответственно).

Секреция лизоцима моноцитами крови и перитонеальными макрофагами, как видно из полученных данных (табл. 2), при бесплодии отличалась от уровня секреции здоровых женщин. При трубно-перитонеальном бесплодии уровень образования лизоцима повышался ($p<0,05$),

Уровень синтеза лизоцима (Лсинт.) моноцитами крови и перитонеальными макрофагами у фертильных женщин и женщин с бесплодием ($M \pm m$)

Группы сравнения	Лсинт. мкг/мл моноцитов	Лсинт. мкг/мл макрофагов	Уровень IL-8 пкг/мл 10^6 кл
1 группа Фертильные женщины	0,49 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,015	118,0 $\pm$ 25,0
2 группа Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием	0,45 $\pm$ 0,008*	0,63 $\pm$ 0,018*	1130,0 $\pm$ 112,0
3 группа Женщины с бесплодием неясного генеза	0,4 $\pm$ 0,02**	0,59 $\pm$ 0,02**	128,0 $\pm$ 30,0

Примечания. * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,001$ — достоверность различий между сравниваемыми группами.

при бесплодии неясного генеза, напротив, снижался ($p < 0,01$).

Как следует из табл. 3, по сравнению со здоровыми фертильными женщинами, у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием наблюдалось снижение синтеза лизоцима моноцитами крови и перитонеальными макрофагами ($p < 0,05$). Еще большее снижение этого фермента моноцитами/макрофагами отмечалось при бесплодии неясного генеза ($p < 0,01$), причем снижение уровня синтеза лизоцима более выражено у перитонеальных макрофагов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при трубно-перитонеальном бесплодии повышенная секреторная активность моноцитов крови по IL-8 сопровождалась лабильзацией лизосомных мембран, повышением секреции и снижением синтеза лизоцима моноцитами крови и перитонеальными макрофагами. При бесплодии неясного генеза незначительное повышение секреции IL-8 сочеталось со стабилизацией лизосомных мембран моноцитов/макрофагов, снижением секреции и синтеза лизоцима этими клетками. Повышение секреции IL-8 моноцитами крови и секреции лизоцима моноцитами/макрофагами тесно связано с лабильзацией лизосомных мембран, при трубно-перитонеальном бесплодии, вероятно, может быть вызвано длительной активацией клеток системы макрофагов как результат хронического воспалительного процесса [10]. Незначительное повышение секреции IL-8, стабилизация лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов, снижение секреции и синтеза лизоцима этими клетками, выявленные при бесплодии неясного генеза, могут отражать скрытые процессы в организме женщины, в том числе латентную инфекцию [5]. Выраженные изменения секреторно-синтетической активности клеток макрофагальной системы при бесплодии неясного генеза открывают новые возможности диагностики и перспективы лечения этой патологии.

Л и т е р а т у р а

1. Бехало В.А., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления // Иммунология. - 2009. - Т. 30, №3. - С. 184-189.
2. Мотавкина Н.С., Шаронов А.С., Ковалев Б.М. Микрометоды в иммунологии. - Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 1987. - 182 с.
3. Назаренко Т.А., Дуриян Э.Р., Перминова С.Г. Современные подходы к диагностике и лечению бесплодия у женщин // Гинекология. - 2004. - Т. 6, №6. - С. 323-325.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ Statistica. - М.: Медиа-сфера, 2002. - 305 с.
5. Федорова Т.А. Бесплодие неясного генеза: некоторые аспекты диагностики и лечения // Гинекология. - 2003. - Т. 5, №3. - С. 98-100.
6. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: развитие, активация, эффекторные функции // RJI. - 1999. - Vol. 4, suppl. 1. - С. 9-15.
7. Череев А.Н. Количественная и функциональная оценка Т- и В-систем иммунитета у человека // Общие вопросы патологии. Итоги науки и техники. - М.: ВИНТИ, 1976. - Т. 4. - С. 124-160.
8. Шаронов А.С. Оценка изменений стабильности лизосомных мембран мононуклеарных фагоцитов как метод аллергоиммунодиагностики и скрининга мембранотропных и радиопротективных препаратов: мет. рек. МЗ СССР. - М., 1989. - 14 с.
9. Шаронов А.С. Фагоциты, лизосомы, мембраны. - Владивосток: Дальнаука, 2007. - 128 с.
10. Швыдченко И.Н., Быковская Е.Ю., Роменская В.А. и др. Влияние глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на продукцию интерлейкина-8 нейтрофильными гранулоцитами при патологии в эксперименте in vitro // Рос. иммунол. журн. - 2009. - Т. 3 (12), №3-4. - С. 288-292.
11. Ярилин А.А. Клеточные основы мукоизального иммунитета // Рос. иммунол. журн. - 2008. - Т. 2(11), №1. - С. 3-19.
12. Bulut Y., Faure E., Thomas L. et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway // J. Immunol. - 2002. - Vol. 168. - P. 1435-1440.

Координаты для связи с авторами: Храмова Ирина Афанасьевна — канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии ВГМУ, e-mail: Svetlana.Klimenko@vvsu.ru, тел.: 8-914-731-24-33; Кольцов Игорь Петрович — зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-63-93,

