

УДК 618.177: 612.017.1: 577.352.333

## ОСОБЕННОСТИ ПОДХОДА К ДИАГНОСТИКЕ ЖЕНСКОГО БЕСПЛОДИЯ С ПОЗИЦИИ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК МАКРОФАГАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

**Храмова И.А., Рачкова Е.В.**

*ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет», Владивосток,  
e-mail: ludmila.kravshuk@vvsu.ru*

Исследована секреция ИЛ-8 моноцитами крови, состояние стабильности лизосомных мембран и секреторно-синтетической активности моноцитов крови и перитонеальных макрофагов 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 усиление 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. Секреция ИЛ-8 моноцитами крови у женщин с бесплодием неясного генеза практически не отличается от уровня здоровых фертильных женщин.

**Ключевые слова:** лизоцим, интерлейкин-8, бесплодие

## CHARACTERISTICS OF THE DIACRISIS TREATMENT OF THE FEMALE INFERTILITY FROM THE PERSPECTIVE OF THE MACROPHAGES SYSTEM CELLS AROUSAL

**Khramova I.A., Rachkova E.V.**

*Vladivostok State Medical University, Vladivostok, e-mail: ludmila.kravshuk@vvsu.ru*

The IL-8 secretion by blood monocytes, the condition of stability of lysosome membranes and secretory synthetic arousal of blood monocytes and peritoneal macrophages of 10 healthy fertile women, 18 women with tubal peritoneal infertility and 8 women with opaque genesis infertility were investigated. It was educed that in case of tubal peritoneal infertility of women the enhancement of the IL-8 secretion by blood monocytes, labialization of monocyte's/macrophage's lysosome membranes, enhacement of secretion and insignificant lapse of lysozyme fusion of the stated cells take place. In case of opaquing genesis infertility the stabilization of the lysosome membranes, decrease of secretion and lysozyme fusion by blood monocytes and peritoneal macrophages takes place. The IL-8 secretion by blood monocytes in case of opaquing genesis infertility doesn't differ significantly from the healthy fertile women's state.

**Keywords:** lysozyme, anionic neutrophil-activating peptide, infertility

Одной из важнейших проблем нарушения репродуктивного здоровья женщины является бесплодие различного генеза. Наиболее распространенной формой этой патологии считается трубно-перитонеальное бесплодие (50–60%). В последние годы возросло число больных с бесплодием неясного генеза (5–10%) [3]. В основе трубно-перитонеального бесплодия, как правило, лежит хроническое воспаление матки и придатков матки, при котором 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 интерли-

кина-8, уровень которого в крови заметно повышается [8, 9, 10]. Секреция лизосомных ферментов сопряжена с состоянием стабильности лизосомных мембран клеток: при лабилизации лизосомных мембран происходит повышение выхода ферментов, при стабилизации – снижение [7].

**Цель исследования** – изучить связь между состоянием стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов, уровнем синтеза и секреции лизоцима этими клетками с процессом их активации при трубно-перитонеальном бесплодии и бесплодии неясного генеза.

### Материал и методы исследования

Исследование проведено у 18 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и 8 женщин с бесплодием неясного генеза. 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. Контрольную группу составили 10 здоровых фертильных женщин, обратившихся к гинекологу за консультацией. Возраст женщин колебался

от 25 до 36 лет ( $30,5 \pm 2,5$  года). Все исследования проводились с учетом информированного согласия женщин.

Выделение моноцитов крови проводилось на градиенте плотности фиколл-верографина центрифугированием крови в течение 30 минут при 400 G с последующим отсасыванием микропипеткой кольца градиента [7]. Клетки прикреплялись к поверхности стекла в течение 60 минут при температуре 37 °C.

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  $6 \cdot 10^6$  кл/мл. Определение стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов с расчетом показателя стабильности (ПСЛМ) проводили методом культивирования выделенных клеток в среде 199 с добавлением 0,5% стерильного L-глутамина и 2,5% смешанной человеческой сыворотки, прогретой в течение 30 мин при 56 °C в течение 12–15 часов при 37 °C. Микрометодом [2] проводили определение секретированного лизоцима ( $L_{секр}$ ), а после 4–6-кратного замораживания-оттаивания культивируемых клеток – общего лизоцима ( $L_{общ}$  – секретированный плюс внутриклеточный). На основании полученных результатов секретированного и общего лизоцима высчитывали ПСЛМ по формуле:  $ПСЛМ = L_{секр}/L_{общ} \cdot 100\%$  [8]. По результатам оценки разницы ( $L_{общ}$ ) после и до культивирования определяли количество синтезированного лизоцима ( $L_{синт}$ ).

Проведенные ранее нами исследования выявили выраженные колебания ПСЛМ в зависимости от фазы менструального цикла. Наибольший подъем показателя стабильности лизосомных мембран наблюдался в день предполагаемой овуляции с последующим снижением до оптимального значения (53–58%) на 19–21 день цикла. Поэтому обследование женщин проводилось во вторую фазу менструального цикла.

Определение интерлейкина – 8 в супернатанте культивированных клеток (оценивалась секреция интерлейкина – 8 моноцитами крови) проводилось

методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «R&D Diagnostics Inc.» (США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ «Statistica 6» с применением методов вариационной статистики и критерия Манна-Уитни для оценки статистически значимых различий. Различие считалось достоверным при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенного исследования было выявлено, что у здоровых фертильных женщин уровень секреции IL-8 моноцитов крови колеблется в пределах от 80 до 130 пг/мл/ $10^6$ кл и в среднем составляет  $118 \pm 25$  пг/мл/ $10^6$ кл. У женщин с трубно-перитонеальным бесплодием происходит значительное возрастание уровня секреции IL-8 по сравнению со здоровыми фертильными женщинами ( $p < 0,01$ ) и составляет  $1130 \pm 112$  пг/мл/ $10^6$ мл, а при бесплодии неясного генеза уровень IL-8 ( $128 \pm 30$  пг/мл/ $10^6$ кл) незначительно превышает этот показатель здоровых фертильных женщин ( $p > 0,05$ ), что соответствует различной степени эндогенной активации клеток-продуцентов интерлейкина, в частности моноцитов.

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

Таблица 1

Показатель стабильности лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов фертильных женщин, женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и бесплодием неясного генеза

Группы сравнения	ПСЛМ в % моноцитов ( $M \pm m$ )	ПСЛМ в % макрофагов ( $M \pm m$ )
Фертильные женщины, уровень секреции IL8 $118 \pm 25$ пг/мл/ $10^6$ кл $p_1$	$52,8 \pm 1,4$	$57,9 \pm 1,5$
Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием, уровень секреции IL8 $1130 \pm 112$ пг/мл/ $10^6$ кл $p_2$	$58,5 \pm 1,2$ $p_1 - p_2^*$	$65,7 \pm 1,3$ $p_1 - p_2^{**}$
Женщины с бесплодием неясного генеза, уровень секреции IL8 $128 \pm 30$ пг/мл/ $10^6$ кл $p_3$	$45,3 \pm 1,9$ $p_1 - p_3^*$	$48,4 \pm 1,8$ $p_1 - p_3^{**}$

Примечание (достоверность различий между сравниваемыми группами)

\* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

Как видно из табл. 1, при трубно-перитонеальном бесплодии наряду с повышением секреции IL-8 происходит выраженное повышение ПСЛМ моноцитов крови и

перитонеальных макрофагов по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно). Установлена прямая сильная корреляцион-

ная связь секреции IL-8 и показателя стабильности лизосомных мембран ( $r < 0,74$ ,  $p < 0,05$ ). Это свидетельствует о происходящей лабильзации лизосомных мембран этих клеток при данной патологии. У женщин с бесплодием неясного генеза при незначительном повышении IL-8, напротив, наблюдается снижение ПСЛМ моноцитов/макрофагов по отношению к здоровым женщинам, что говорит о стабилизации лизо-

сомных 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 отличается от уровня секреции здоровых женщин: при трубно-перитонеальном бесплодии она повышена ( $p < 0,05$ ), при бесплодии неясного генеза, напротив, снижена ( $p < 0,01$ ).

**Таблица 2**

Уровень секреции лизоцима ( $L_{секр}$ ) моноцитами крови и перитонеальными макрофагами у фертильных женщин, женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и бесплодием неясного генеза

Группы сравнения	$L_{секр}$ , мкг/мл, моноцитов ( $M \pm m$ )	$L_{секр}$ , мкг/мл, макрофагов ( $M \pm m$ )
Фертильные женщины, уровень IL8 $118 \pm 25$ пкг/мл $10^6$ кл $p_1$	$0,7 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,018$
Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием, уровень IL8 $1130 \pm 112$ пкг/мл $10^6$ кл $p_2$	$0,78 \pm 0,015$ $p_1 - p_{2*}$	$0,96 \pm 0,014$ $p_1 - p_{2*}$
Женщины с бесплодием неясного генеза, уровень IL8 $128 \pm 30$ пкг/мл $10^6$ кл $p_3$	$0,6 \pm 0,01$ $p_1 - p_{3**}$ $p_2 - p_{3**}$	$0,76 \pm 0,03$ $p_1 - p_{3**}$ $p_2 - p_{3***}$

**Примечание** (достоверность различий между сравниваемыми группами)  
\* -  $p_1 < 0,01$ ; \*\* -  $p_2 < 0,001$ ; \*\*\* -  $p_3 < 0,001$ .

Как видно из табл. 3, по сравнению со здоровыми фертильными женщинами при трубно-перитонеальном бесплодии наблюдается снижение синтеза лизоцима моноцитами крови и перитонеальными макрофагами

( $p < 0,05$ ). Еще большее снижение этого фермента моноцитами/макрофагами отмечается при бесплодии неясного генеза ( $p < 0,01$ ). Причем снижение синтеза лизоцима перитонеальными макрофагами более выражено.

**Таблица 3**

Синтез лизоцима ( $L_{синт}$ ) моноцитами крови и перитонеальными макрофагами у фертильных женщин, женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и бесплодием неясного генеза

Группы сравнения	$L_{синт}$ , мкг/мл, моноцитов ( $M \pm m$ )	$L_{синт}$ , мкг/мл, макрофагов ( $M \pm m$ )
Фертильные женщины, уровень IL8 $118 \pm 25$ пкг/мл $10^6$ кл $p_1$	$0,49 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,015$
Женщины с трубно-перитонеальным бесплодием, уровень IL8 $1130 \pm 112$ пкг/мл $10^6$ кл $p_2$	$0,45 \pm 0,008$ $p_1 - p_{2*}$	$0,63 \pm 0,018$ $p_1 - p_{2*}$
Женщины с бесплодием неясного генеза, уровень IL8 $128 \pm 30$ пкг/мл $10^6$ кл $p_3$	$0,4 \pm 0,02$ $p_1 - p_{3**}$	$0,59 \pm 0,02$ $p_1 - p_{3**}$

**Примечание** (достоверность различий между сравниваемыми группами)  
\* -  $p < 0,01$ ; \*\* -  $p < 0,001$ .

Описанные результаты свидетельствуют о том, что при трубно-перитонеальном бесплодии происходит лабильзация лизосомных мембран моноцитов крови и перитонеальных макрофагов с повышением секреции и снижением синтеза лизоцима этими клетками и активацией секреции IL-8 моноцитами крови. При бесплодии неясно-

го генеза незначительное повышение секреции IL-8 сочетается 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 связанное с лабильзацией лизосомных мембран, при

трубно-перитонеальном бесплодии может быть вызвано длительной активацией клеток системы макрофагов как результата 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]. Таким образом, выраженные изменения секреторно-синтетической активности клеток макрофагальной системы при бесплодии неясного генеза открывают новые возможности диагностики и перспективы лечения этой патологии.

#### Список литературы

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 Дальневосточного университета, 1987. – 182 с.
3. Назаренко Т.А., Дуринян Э.Р., Перминова С.Г. Современные подходы к диагностике и лечению бесплодия у женщин // Гинекол. – 2004. – Т.6, №6. – С. 323–325.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ «Statistica». – М.: Изд-во 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 // РЖ. – 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 алергоиммунодиагностики и скрининга мембранотропных и радиопротективных препаратов: метод. рекомендации 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. 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.

#### Рецензенты:

Запорожец Т.С., д.м.н., зам. директора по научной части, в.н.с. НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток;

Лукьянов П.А., д.х.н., профессор, зав. отделом молекулярной иммунологии УАН «Тихоокеанский институт биоорганической химии» ДВО РАН, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 30.06.2011.