

Оценка апоптоза у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием

С. Н. Теплова, Б. И. Медведев, Л. Ф. Зайнетдинова

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

Evaluation of apoptosis in women with tubo-peritoneal infertility

S. N. Teplova, B. I. Medvedev, L. F. Zaynetdinova

Резюме

Цель исследования: оценить апоптоз лимфоцитов крови, уровень sFas рецептора в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при выявлении ВПГ1,2 в ткани женских гонад при трубно-перитонеальном бесплодии.

Материалы и методы исследования: обследовано 29 пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием. Методы исследования включали сбор анамнеза, анализ жалоб пациенток, проведение бимануального, инструментального, микробиологического и иммунологического исследований.

Результаты: у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, сочетающимся с генитальной герпетической инфекцией, локализованной в яичниках происходит рост абсолютного числа лимфоцитов с готовностью к Fas-зависимому апоптозу, однако, при этом не происходит увеличения количества лимфоцитов с признаками фрагментации ядра. Растворимый sFas рецептор в сыворотке крови существенно ниже, а в перитонеальной жидкости в двое выше. у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, ассоциированным с генитальной герпетической инфекцией.

Выводы: развитие инфекционного воспаления связано с процессами торможения апоптоза за счет способности вирусов вырабатывать вещества — ингибиторы процесса клеточной гибели.

Ключевые слова: апоптоз, растворимый sFas рецептор, трубно-перитонеальное бесплодие, генитальная герпетическая инфекция.

Resume

The purpose of this study is evaluation of lymphocyte apoptosis and the level of soluble Fas receptors in serum and peritoneal fluid in women with tubo-peritoneal infertility, associating with Virus herpes simplex 1, 2 infection in ovarian tissues.

Methods/data base: 29 patients with TPI, associated with herpes infection in ovarian glands, which were revealed by polymerase chain reaction (PCR), were investigated.

Methods: direct method of verification of genetic virus material in ovarian (PCR), determination of CD95 markers, morphological evaluation of lymphocyte apoptosis by supravital dyeing with Hoechst 33342 (Boehringer Mannheim), measuring of soluble Fas receptors in serum and peritoneal fluid by immunofluorescent methods.

Results: Number of lymphocytes with membrane receptor CD95 are increased in women with TPI, associated with herpes infection in ovarian glands, but quality of cells with morphological signs of apoptosis are stable. The level of soluble Fas receptors in peritoneal fluid is higher in comparison with concentration of receptors in serum.

Conclusion: Development of TPI, associated with genital herpes infection of ovarian glands, leads to growth of the level of soluble Fas receptors, especially in peritoneal cavity, that may be changes cell apoptosis in organs of pelvium.

Key words: apoptosis, CD95, sFas receptors, tubo-peritoneal infertility, genital herpes virus infection.

Введение

Апоптоз или запрограммированная гибель клетки в многоклеточном организме регистрируется в условиях нормы и при патологии. В физиологических условиях процессы апоптоза лежат в основе обеспечения генетического гомеостаза клеток организма, уничтожения ге-

нетически уклоняющихся в своем развитии мутантных клеток. Fas-зависимый апоптоз участвует также в завершении иммунного ответа посредством делеции активированных зрелых Т-лимфоцитов, кроме того, он также важен для предупреждения развития воспаления в «иммуноприлегирированных» тканях: глазах, мозге, гонадах и т.д., где экспрессия FasL очень высока [1]. В патологии важной биологической функцией апоптоза является уничтожение клеток, инфицированных вирусом или другими внутриклеточными патогенами [1,2,3,4]. Мембранными рецепторами готовности клеток к

С. Н. Теплова — д. м. н., профессор, зав. каф. аллергологии и иммунологии;

Б. И. Медведев — д. м. н., профессор, зав. каф. акушерства и гинекологии №1;

Л. Ф. Зайнетдинова — к. м. н., ассистент каф. акушерства и гинекологии №1.

апоптозу являются Fas (CD95, APO-1), TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1) и соответствующие им лиганды (Fas-лиганд и TNF- α) [5]. Fas-рецепторы (Fas-R) присутствуют на множестве клеток, в то время как FasL, в основном, расположены на Т-лимфоцитах. При развитии рецептор — зависимого апоптоза происходит связывание рецептора готовности к апоптозу и лиганда, например, Fas-R и FasL, далее активируется внутриклеточный домен смерти (Fas-associated death domain), что приводит к активации каскада каспаз и, в конечном счете, к гибели клетки-мишени [1,5]. Причиной устойчивости различных типов клеток к Fas-зависимому апоптозу может быть повышенная продукция растворимых рецепторов (sFas, sFasL), которые блокируют и предотвращают клеточно-клеточные взаимодействия через соответствующие мембранные рецепторы. Согласование процессов пролиферации и апоптоза клеток каждого органа и системы лежит в основе постоянства клеточного состава тканей. В связи с этим до сих пор мало изученные процессы апоптоза лимфоцитов, а также пролиферации и апоптоза клеток яичников при трубно-перитонеальном бесплодии, развивающемся на фоне генитальной герпетической инфекции с локализацией вируса в яичниках и без герпетической инфекции, представляют интерес для анализа патогенеза данной патологии.

Цель исследования: оценить апоптоз лимфоцитов крови, уровень sFas рецептора в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при выявлении ВПГ 1,2 в ткани женских гонад при трубно-перитонеальном бесплодии.

Материал и методы исследования

Проведено обследование 29 пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием. Первую группу составили 16 женщин, у которых установлена атипичная форма генитальной герпетической инфекции с верификацией ВПГ 1,2 в яичниках. Вторую — 13 женщин с ТПБ, у которых герпетические вирусы в половой системе ПЦР методом не были обнаружены. В третью группу (контрольную) включены 14 здоровых женщин репродуктивного возраста.

Критериями включения в первую группу были:

- репродуктивный возраст;
- трубно-перитонеальное бесплодие;
- наличие ВПГ 1,2 в яичниках, верифицированное с помощью ПЦР;
- отсутствие других инфекций, передающихся половым путем.

Критериями включения во вторую группу были:

- репродуктивный возраст;

- трубно-перитонеальное бесплодие;
- отсутствие инфекций, передающихся половым путем.

Методы обследования включали: сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотры пациенток, общее клинико-лабораторное обследование, проведение инструментального (УЗИ, лапароскопия), микробиологического, иммунологического и иммуногистохимического исследований. Микробиологическое исследование проводилось путем обследования пациенток методом ПЦР на инфекции, передающиеся половым путем, включая вирус простого герпеса (ВПГ 1,2) в биоптатах яичников.

Иммунологическое исследование включало определение на лимфоцитах крови маркеров готовности к апоптозу (CD95+), морфологическую оценку апоптоза, уровень sFas в крови и перитонеальной жидкости.

Лимфоциты крови выделяли методом градиентного центрифугирования по Boyum A. (1968). Число лимфоцитов крови, экспрессирующих CD95 рецептор, определяли с помощью непрямого иммунофлюоресцентного метода на основе моноклональных антител производства НПО «Препарат» (Новосибирск). Морфологическую оценку фрагментации ядра лимфоцитов проводили с помощью окрашивания Hoechst 33342 (Boehringer Mannheim), который накапливается в ядрах окрашиваемых клеток. Учет осуществляли на микроскопе ЛЮМАМ-И1 при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 470 нм. Подсчитывали процент клеток с морфологическими признаками апоптоза (Vermes I. et al., 2000).

Растворимый Fas[sFas] определяли в сыворотке крови и перитонеальной жидкости пациенток иммуноферментным методом с помощью тест-системы: Austria. Beuder Med Systems Gimble numan sAPO 1|Fas BMS 245 LOT 335 35230, регистрация результатов — на «Multiscan Plus» [Labsystem] при длине волны 450 нм.

Полученные материалы исследования статистически обработаны с помощью программы «Statistica 6» с использованием параметрических и непараметрических методов. Результаты исследования в таблицах представлены в виде средней арифметической (M) и ошибки средней (m), а также в виде медианы (Me) и квартильного размаха (Q25-Q75). Минимальный уровень достоверности при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Для анализа процессов программированной клеточной гибели лимфоцитов крови у женщин с ТПБ на первом этапе данного исследования было определено общее число лимфоцитов крови и количество лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к апоптозу, чис-

Таблица 1. Анализ маркеров апоптоза лимфоцитов крови у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием

Показатели	1 группа Больные с ТПБ и генитальной герпетической инфекцией, n=16		2 группа Больные с ТПБ, n=9		3 группа контрольная (здоровые женщины), n=14		P
	Me	QL-QU	Me	QL-QU	Me	QL-QU	
Лейкоциты	5,6	4,8-6,0	4,8	4,3-5,8	4,65	4,2-5,1	0,09
Лимфоциты	29,5	26,0-33,0	28,0	25,0-30,0	26	23-27	0,03 ₁₋₃
CD95%	12%	12%-15%	12%	10%-12%	10%	8%-12%	
CD95 (абс.)	0,19	0,17-0,23	0,15	0,2-0,21	0,14	0,1-0,21	0,04 ₁₋₂ 0,04 ₁₋₃
Клетки с фрагментацией ядра (%)	2,5%	1,5%-5%	3%	2%-7%	3%	3%-4%	
Клетки с фрагментацией ядра (абс.)	0,03	0,01-0,085	0,03	0,02-0,07	0,045	0,02-0,07	0,08
ИРА	15,8		20		32,14		0,2
sFas (пг/мл)	52,72	49,14-56,94	74,78	50,57-93,62	-	-	0,04

Примечание. Достоверность различий по критерию Вальда-Вольфовица.

Таблица 2. Уровень sFas в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, сочетающимся с генитальной герпетической инфекцией

Показатели	Перитонеальная жидкость, n=12		Сыворотка крови, n=16		P	
	Me	QL-QU	Me	QL-QU	W-W	KS
sFas (пг/мл)	112,3	106,4-124,6	52,725	49,14-56,94	0,01	0,01

Примечание. достоверность различий по критерию Вальда – Вольфовица, Колмогорова-Смирнова

ло лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза в виде фрагментации ядра клеток, уровень растворимого sFas рецептора в крови. Данные, полученные у пациенток с ТПБ в сочетании с верифицированной с помощью ПЦР генитальной герпетической инфекцией, локализованной в яичниках, а также у пациенток с ТПБ без этой инфекции и у здоровых женщин приведены в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что в группе пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, сочетающимся с герпетической инфекцией, локализованной в тканях яичника, общее число лимфоцитов, а также количество лимфоцитов с готовностью к апоптозу (CD95+) оказалось существенно выше в сопоставлении с больными, имеющими данную форму бесплодия без ассоциации с генитальной герпетической инфекцией, а также с группой здоровых женщин репродуктивного возраста. Рост общей численности лимфоцитов в крови следует рассматривать как адекватную реакцию иммунной системы на герпетическую инфекцию, связанную с формированием клеточного иммунного ответа. Параллельно увеличению общего количества лимфоцитов в крови происходит рост абсолютного числа лимфоцитов с готовностью к Fas-зависимому апоптозу (CD95 клеток). Однако, рост числа лимфоцитов с готовностью к

апоптозу у пациенток 1 группы не сопровождался увеличением количества лимфоцитов с признаками фрагментации ядра, свидетельствующими о необратимости процесса апоптоза. Индекс реализации апоптоза, т.е. процент лимфоцитов с завершённым процессом программированной клеточной смерти от общего числа лимфоцитов с готовностью к апоптозу (ИРА) оказался минимальным у женщин с генитальной герпетической инфекцией, хотя разница между группами статистически не достоверна.

Дальнейший анализ изменений механизмов апоптоза лимфоцитов был проведен на основе определения растворимого (sFas) рецептора в сыворотке крови пациенток, который оказался существенно ниже у пациенток с ТПБ, ассоциированным с генитальной герпетической инфекцией, чем у пациенток с аналогичной патологией без герпетической инфекции.

Далее нами было проведено параллельное определение sFas рецептора в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у пациенток 1 группы с наличием вируса герпеса в яичниках (табл. 2).

В перитонеальной жидкости у женщин с ТПБ, сочетающимся с наличием ВПГ1,2 в яичниках, уровень sFas рецептора был приблизительно вдвое выше, чем в сыворотке крови