

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК: 618.146 – 002 – 06: 616.69 – 008.8] – 097

МЕСТНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ СЛИЗИ ЖЕНЩИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НИЖНЕГО ОТДЕЛА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ СПЕРМЫ ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН

В. Б. Маякова

Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия

LOCAL IMMUNE RESPONSE OF CERVICAL MUCUS NEUTROPHILES IN WOMEN WITH INFLAMMATORY DISEASES OF LOWER UROGENITAL PART UNDER THE EFFECT OF HEALTHY MEN'S DIFFERENT SPERM FRACTIONS

V. B. Mayakova

South Ural State University of Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation

Цель. Определить механизмы реализации местного иммунного ответа нейтрофилов цервикальной слизи женщины с воспалительными заболеваниями нижнего отдела уrogenитального тракта (ВЗНОУТ) при воздействии на них спермой здоровых мужчин и ее фракциями.

Материалы и методы. Возможность нормального функционирования репродуктивной системы у женщин обеспечивается иммунологическими барьерами и нормальной реализацией иммунорегуляторных механизмов. При воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта меняется иммунный гомеостаз, что может нарушить нормальный репродуктивный процесс. Для исследования использовалась цервикальная слизь 20 женщин с ВЗНОУТ (по результатам микроскопического, бактериологического, серологического, молекулярно-биологического методов исследования) в первую фазу менструального цикла, которая помещалась в 1,0 мл раствора Хенкса, тщательно суспензировалась. Семенная жидкость 20 практически здоровых мужчин разделялась на составляющие путем центрифугирования в течение 10 минут на 3000 оборотах в мин. Таким образом, получались надосадочная и осадочная части эякулята. Для дальнейшего исследования цервикальную слизь и раствор Хенкса, цервикальную слизь и цельную семенную жидкость, цервикальную слизь и осадок спермы, цервикальную слизь и надосадочную часть спермы инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в соотношении 1:1. После инкубации оценивали жизнеспособность и функциональную активность нейтрофилов цервикального секрета. За контроль (группа 1) были

© Маякова В. Б., 2014
e-mail: sunrisevd@mail.ru
тел. 8 950 731-10-78

[Маякова В. Б. – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики].

приняты значения показателей жизнеспособности и функциональной активности взвеси нейтрофилов цервикальной слизи в растворе Хенкса. Группы сравнения: значения показателей жизнеспособности и функциональной активности нейтрофилов цервикальной слизи под воздействием цельной спермы (группа 2), под действием осадочной фракции спермы (группа 3), под действием надосадочной фракции спермы (группа 4).

Результаты. При воздействии надосадка спермы здоровых мужчин повышается фагоцитарная функция нейтрофилов цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ в сравнении с воздействием осадком, когда показатели фагоцитоза достоверно снижаются. При анализе жизнеспособности клеток цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ при воздействии на них различными фракциями спермы здоровых мужчин наблюдаются изменения в соотношении клеток в разных фазах жизненного цикла. Надосадочная часть спермы достоверно снижает количество живых клеток.

Выводы. Цельная семенная жидкость и ее надосадочная фракция снижают жизнеспособность нейтрофилов цервикальной слизи, осадочная фракция обладает угнетающим действием на фагоцитарную функцию нейтрофилов цервикальной слизи, в то время как надосадочная фракция стимулирует ее.

Ключевые слова. Нейтрофилы, цервикальная слизь, сперма, фагоцитоз, жизнеспособность.

The possibility of normal functioning of female reproductive system is provided by immunological barriers and normal realization of immunoregulating mechanisms. Immune hemostasis is changed in case of inflammatory diseases of reproductive tract that can impair the normal reproductive process.

Aim. To determine the mechanisms of local immune response of cervical mucus neutrophiles in women with inflammatory diseases of the lower part of urogenital tract (IDLPUT) under the effect of healthy men's sperm and fractions.

Materials and methods. Cervical mucus of 20 women with IDLPUT (by the results of microscopic, bacteriological, serological, molecular-biological methods of study) in the first phase of menstrual cycle was placed into 1,0 ml of Hanks' solution, thoroughly suspended and studied. Seminal fluid of 20 practically healthy men was divided into components by centrifugation during 10 minutes at 3000 turns per minute. Thus, supernatant and sedimentary parts of ejaculate were produced. For further study, cervical mucus and Hanks' solution, cervical mucus and whole seminal fluid, cervical mucus and sperm sediment, cervical mucus and supernatant part of sperm were incubated for 30 minutes at 37°C in the ratio of 1:1. After incubation, viability and functional activity of cervical secretion neutrophiles was assessed. Viability and functional activity values of cervical mucus neutrophile suspension in Hanks' solution were accepted as the control (group 1). Comparison groups included viability and functional activity values of cervical mucus neutrophiles under the effect of whole sperm (group 2), under the effect of sedimentary fraction of sperm (group 3), under the effect of supernatant fraction of sperm (group 4).

Results. Under the effect of healthy men's sperm supernatant, phagocytic function of cervical mucus neutrophiles in women with IDLPUT is growing as compared to the effect of sediment when phagocytosis indices reliably decrease.

When analyzing viability of cervical mucus cells (in women with IDLPUT) under the effect of different fractions of healthy men's sperm, there are observed changes in the ratio of cells during different phases of vital cycle. Supernatant part of sperm significantly lowered the number of bioplasts.

Conclusions. Whole seminal fluid and its supernatant fraction decrease viability of cervical mucus neutrophiles; sedimentary fraction has inhibiting action on phagocytic function of cervical mucus neutrophiles, whereas supernatant fraction stimulates it.

Key words. Neutrophiles, cervical mucus, sperm, phagocytosis, viability.

ВВЕДЕНИЕ

По определению Всемирной организации здравоохранения, репродуктивное здоровье – это важнейшая составляющая общего здоровья человека. Оно подразумевает состояние полного физического, умственного и социального благополучия, характеризующее способность людей к зачатию и рождению детей, возможность сексуальных отношений без угрозы заболеваний, передающихся половым путем, гарантию безопасности беременности, родов, выживание и здоровье ребенка, благополучие матери, возможность планирования следующих беременностей, в том числе и предупреждение нежелательных. Возможность нормальной функции репродуктивной системы у здоровых женщин детородного периода обеспечивается наличием иммунологических барьеров и нормальным функционированием иммунорегуляторных механизмов [1]. Ведущее значение в антимикробной устойчивости гениталий принадлежит нейтрофилам цервикального секрета, поскольку по количеству и функциональной активности они превосходят гранулоциты других секретов гениталий и составляют 96 % всех клеток и более. Большой интерес к изучению состояния нейтрофилов цервикальной слизи обусловлен тем, что они являются основными иммуноэффекторными клетками, осуществляющими первую встречу с патогеном [3, 4]. Многими авторами описано состояние местной антимикробной защиты репродуктивного тракта, а также отмечено изменение иммунологических показателей цервикальной слизи у пациенток с воспалительными заболеваниями репродуктивного тракта: повышение общего количества лейкоцитов, увеличение процента жизнеспособных клеток, усиление лизосомальной активности и внутриклеточного кислородозависимого метаболизма нейтрофилов, угнетение резерва их бактерицидной функции, а также снижение активности и интенсивности фагоци-

тоза [3–5]. Проведенные исследования доказывают значительную автономность местного иммунитета слизистых оболочек репродуктивного тракта, а также позволяют предположить, что воспаление нижнего отдела гениталий регулируется, в основном, факторами локального иммунитета, так как при кольпитах и цервицитах в цервикальной слизи регистрируются изменения уровней иммуноглобулинов, цитокинов, компонентов комплемента, лизоцима, реактантов острой фазы, а также признаки функционального возбуждения основной клеточной популяции секрета – нейтрофильных гранулоцитов [4]. Известно, что нормальная имплантация и последующее развитие эмбриона и плода осуществляются благодаря уникальным иммунологическим механизмам, в частности, включающим влияние семенной жидкости на репродуктивную функцию женщины [2]. Изменение иммунного гомеостаза может нарушить нормальный репродуктивный процесс и привести к бесплодию [6]. Иммунологическая форма бесплодия, согласно рекомендациям ВОЗ [7], выделена в отдельную нозологию.

Цель данного исследования – определить, каким образом происходит реализация местного иммунного ответа нейтрофилов цервикальной слизи женщины с воспалительными заболеваниями нижнего отдела урогенитального тракта (ВЗНОУТ) при воздействии на них спермой здоровых мужчин и ее фракциями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа использовалась цервикальная слизь 20 женщин с ВЗНОУТ (по результатам микроскопического, бактериологического, серологического, молекулярно-биологического методов) в первую фазу менструального цикла, которая помещалась в 1,0 мл раствора Хенкса и тщательно суспензировалась.

Семенная жидкость, полученная механическим путем после трехдневного воздержания у 20 практически здоровых мужчин, разделялась на составляющие путем центрифугирования в течение 10 минут на 3000 оборотах в мин. Таким образом получались надосадочная и осадочная части эякулята. Для дальнейшего исследования цервикальную слизь и раствор Хенкса, цервикальную слизь и цельную семенную жидкость, цервикальную слизь и осадок спермы, цервикальную слизь и надосадочную часть спермы инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в соотношении 1:1. После инкубации оценивали жизнеспособность и функциональную активность нейтрофилов цервикального секрета (кислородзависимый метаболизм нейтрофилов методом спонтанного и индуцированного НСТ-теста в модификации Маянского, показатели активности фагоцитоза, лизосомальная активность), а также определяли нейтрофильные внеклеточные ловушки цервикального секрета.

Определение лизосомальной активности: 0,1 мл суспензии смешивали с 0,05 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. После 30-минутной инкубации при температуре 37°С клетки помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и под иммерсией исследовали в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа «ЛЮМАМ». Определяли лизосомальную активность – число нейтрофилов, имеющих лизосомальные гранулы (%), а также проводили подсчет лизосом в нейтрофилах полуколичественно в «крестах». При заполнении гранулами лизосом всей цитоплазмы нейтрофила их количество оценивали тремя крестами (+++); наполовину заполненную лизосомами цитоплазму клетки – двумя (++) ; наличие в цитоплазме единичных лизосом – одним (+). При отсутствии лизосом клетка считалась «нулевой». Для подсчета индекса суммарной

люминесценции лизосом (ИСЛЛ), выраженного в условных единицах, использовали формулу

$$\text{ИСЛЛ} = A \cdot 1 + B \cdot 3 + C \cdot 10 + D \cdot 0,$$

где A, B, C, D – количество клеток с заполнением цитоплазмы лизосомальными гранулами на +, ++, +++ или с их отсутствием соответственно.

Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов оценивали в аранжировке А. Н. Маянского и М. Е. Виксмана. В пробирки с 0,2 мл взвеси клеток добавляли 0,1 мл 0,2 % раствора НСТ в 0,1 мл фосфатного буфера (рН 7,4). После 30-минутной инкубации при температуре 37°С к реакционной смеси добавляли 3 мл 0,1 Н раствора соляной кислоты для остановки реакции. Пробирки центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость сливали, из осадка готовили мазки. После высушивания препараты фиксировали метанолом и окрашивали 0,1 % водным раствором сафранина. Учет реакции производили с помощью иммерсионной микроскопии при увеличении 90×10×1,5. Параллельно с помощью НСТ-теста определяли способность нейтрофилов цервикальной слизи отвечать повышением метаболической активности на стимуляцию частицами латекса. Для этого в пробирку с исследуемым материалом (200 мкл) и НСТ (100 мкл) добавляли 20 мкл монодисперсного полистирольного латекса с диаметром частиц 1,7 мкм в концентрации 1·10⁸ частиц/мл. При учете реакции определяли процент НСТ-позитивных клеток и учитывали интенсивность реакции по формуле

$$\text{Интенсивность НСТ} = \frac{A \cdot 3 + B \cdot 2 + C \cdot 1}{100},$$

где A, B, C – число клеток соответственно с отложением диформаза, превышающим размеры ядра, занимающим более 1/3 площади цитоплазмы и менее 1/3 ее площади. Кроме того, рассчитывали функциональный

резерв нейтрофилов (ФРН), который определялся как соотношение между коэффициентами интенсивности реакции НСТ-индуцированного и НСТ-спонтанного тестов.

Для оценки фагоцитарной функции 200 мкл суспензии клеток смешивали с 20 мкл взвеси частиц полистирольного латекса. После одночасовой инкубации при температуре 37°C из клеток готовили препараты, которые высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому–Гимзе. С помощью иммерсионной микроскопии оценивали активность фагоцитоза – процент нейтрофилов, захвативших хотя бы одну частицу латекса, и интенсивность фагоцитоза – число поглощенных микросфер латекса на один фагоцит.

Для обнаружения нейтрофильных ловушек цервикальную слизь (из разведения в растворе Хенкса) в количестве 0,1 мл вносили в 0,9 мл физиологического раствора. 0,1 мл полученной суспензии смешивали с 0,1 мл сложного красителя, который готовили *ex tempore* в отдельной пробирке: 1 мл синьки Эванса в концентрации 1:8000 смешивали с 1 мл красителя Sytox Green в концентрации 1:500. Инкубировали в течение 5 минут в темноте. Из окрашенного материала готовили препарат «раздавленная капля». Учет проводили с помощью люминесцентного микроскопа, используя фильтры, обеспечивающие возбуждающий свет с дли-

ной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. Погибшие клетки и нейтрофильные ловушки окрашивались в ярко-зеленый цвет, жизнеспособные клетки и слизь – в ярко-оранжевый. При этом количественно оценивали жизнеспособность нейтрофилов, так как при таком способе происходит дифференцированное окрашивание клеток: группа 1 объединяет жизнеспособные клетки ярко-оранжевого цвета, группа 2 включает клетки с зеленым ядром и ярко-оранжевой цитоплазмой (подвергшиеся апоптозу), группа 3 – погибшие клетки зеленого цвета и к группе 4 относят свободные лежащие ярко-зеленые волокна, представляющие собой нити ДНК нейтрофила (нейтрофильные внеклеточные ловушки). Проводят подсчет 100 морфологических форм разных групп и определяют их процентное соотношение.

За контроль (группа 1) были приняты значения показателей жизнеспособности и функциональной активности взвеси нейтрофилов цервикальной слизи в растворе Хенкса. Группы сравнения составили: значения показателей жизнеспособности и функциональной активности нейтрофилов цервикальной слизи под воздействием цельной спермы (группа 2), под действием осадочной фракции спермы (группа 3), под действием надосадочной фракции спермы (группа 4). Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Влияние семенной жидкости здоровых мужчин и ее составляющих на функциональную активность нейтрофилов цервикального секрета женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Лизосомальная активность, усл. ед.	160,31 ± 28,66	150,38 ± 27,01	179,25 ± 28,75	134,25 ± 26,45
Спонтанный НСТ-тест нейтрофилов, %	21,59 ± 4,62	18,71 ± 2,64	14,65 ± 3,44	27,13 ± 5,55
Спонтанный НСТ-тест нейтрофилов, усл. ед.	0,27 ± 0,08	0,21 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,29 ± 0,06
Индукцированный НСТ-тест нейтрофилов, %	19,65 ± 3,38	21,35 ± 2,97	15,76 ± 3,92	25,71 ± 5,76

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Индукцированный НСТ-тест нейтрофилов, усл. ед.	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,28 ± 0,06
Интенсивность фагоцитоза	0,36 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,23 ± 0,09	0,42 ± 0,06***
Активность фагоцитоза, %	25,18 ± 4,18	24,12 ± 3,96	10,08 ± 1,54*, **	29,25 ± 3,45***
Фагоцитарное число	1,42 ± 0,12	1,22 ± 0,09	2,85 ± 1,70	1,39 ± 0,07***

Примечание: * – достоверные отличия показателей от группы 0; ** – достоверное различие от группы 1; *** – достоверное различие от группы 2; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние семенной жидкости здоровых мужчин и ее составляющих на жизнеспособность нейтрофилов цервикального секрета женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Живые, %	26,00 ± 3,34	21,63 ± 3,54	27,06 ± 4,46	12,25 ± 3,03*, ***
Мертвые, %	11,44 ± 2,38	31,69 ± 4,49*	15,69 ± 2,92**	38,63 ± 5,49*, ***
Апоптоз, %	46,63 ± 5,25	23,31 ± 3,75*	38,56 ± 6,41	28,88 ± 4,30*
Ловушки, %	14,88 ± 3,35	23,38 ± 4,68	18,31 ± 5,42	19,69 ± 3,81

Примечание: * – достоверные отличия показателей от группы 0; ** – достоверное различие от группы 1; *** – достоверное различие от группы 2; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке полученных данных мы наблюдаем, что при воздействии надосадка спермы здоровых мужчин повышается фагоцитарная функция нейтрофилов цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ в сравнении с воздействием осадком, когда показатели фагоцитоза достоверно снижаются. При анализе жизнеспособности клеток цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ при воздействии на них различными фракциями спермы здоровых мужчин наблюдаются изменения в соотношении клеток в разных фазах жизненного цикла. Надосадочная часть спермы достоверно снижает количество живых клеток. Увеличение процентного соотношения мертвых клеток и уменьшение процентного соотношения клеток в фазе апоптоза наблюдается при добавлении цельной спермы и ее надосадка.

Выводы

Воздействие цельной семенной жидкостью и ее надосадочной фракцией здоровых мужчин на нейтрофилы цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ приводит к снижению их жизнеспособности. Осадочная фракция спермы здоровых мужчин обладает угнетающим действием на фагоцитарную функцию нейтрофилов цервикальной слизи женщин с ВЗНОУТ, в то время как надосадочная фракция стимулирует ее.

Библиографический список

1. Алешкин В. А., Ложкина А. Н., Загородняя Э. Д. Иммунология репродукции: пособие для врачей, ординаторов и научных работников. Чита 2004; 79.
2. Бабаян А. А., Смольникова В. Ю., Николаева М. А., Степанова Е. О., Калинина Е. А. Влияние иммунорегуляторных свойств семенной плазмы на репродуктивную

- функцию женщин. Гинекология 2012; 4: 80–82.
3. Долгушина В. Ф. Диагностика, лечение воспалительных заболеваний нижнего отдела половых органов, прогнозирование и профилактика их осложнений у беременных (клинико-иммунологическое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Харьков 1991; 43.
 4. Савочкина А. Ю. Иммунологические показатели в диагностике хронического цервицита и при его сочетании с хроническим эндометритом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск 2006; 29.
 5. Телешева Л. Ф. Иммунологические факторы секретов репродуктивного тракта женщины: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Челябинск 2000; 42.
 6. Черешнев В. А., Пичугова С. В., Тулакина Л. Г., Клейн А. В., Савинова Т. Л., Бейкин Я. Б. Ультраструктура сперматозоидов в норме и при патологии. Екатеринбург: Изд-во РИО УрО РАН 2013; 84.
 7. Mostafa T., Tawadrous G., Roaia M. M. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia* 2006; 38 (6): 221–224.

Материал поступил в редакцию 18.05.2014