

УДК 618.14-002

ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И АСПИРАТА ЭНДОМЕТРИЯ БОЛЬНЫХ ЭНДОМЕТРИОЗОМ И МИОМОЙ МАТКИ

© А.М. Маржевская, О.И. Гришанина, В.А. Линде, Е.Б. Сиваченко,
А.В. Куртова, О.А. Анциферова, Л.А. Уткина, Е.Е. Зуева

Marzhevskaya A.M., Grishanina O.I., Linde V.A., Sivachenko E.B., Kurtova A.V., Antsiferova O.A., Utkina L.A., Zueva E.E. Immune-competent cells of peripheral blood and endometrium aspirate in endometriosis and uterus myoma patients. The main goals of the research were to find an optimum method of research of endometrium and peripheral blood immune-competent cells and to analyze sub-population structure of endometrium and peripheral blood lymphocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Роль иммунной системы в патогенезе заболеваний женской репродуктивной сферы – зона пристального внимания исследователей в последние десятилетия [1, 2]. Это касается в первую очередь эндометриоза и, в несколько меньшей степени, миомы матки [3, 4].

Большое значение в исследованиях, касающихся иммунной составляющей патогенеза заболеваний, придается объективности и информативности используемых методов. С этой точки зрения перспективным представляется использование метода проточной цитометрии [5]. Метод проточной цитометрии является «золотым стандартом» идентификации иммунокомпетентных клеток в различных биоматериалах. К достоинствам данного метода можно отнести быструю нетрудоемкую пробоподготовку, разработанную систему контроля и качества, отсутствие радиоактивных воздействий, точность исследования и воспроизводимость результатов [6].

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 1) Разработка такого алгоритма пробоподготовки аспириата эндометрия, при котором, разрушив межклеточные контакты, удастся не нарушить соотношение субпопуляций иммунокомпетентных клеток и сохранить жизнеспособность и рецепторный аппарат этих клеток.
- 2) Поиск оптимального метода исследования иммунокомпетентных клеток эндометрия и периферической крови.
- 3) Проведение анализа субпопуляционного состава лимфоцитов эндометрия и периферической крови методом проточной цитометрии больных эндометриозом и миомой матки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве биологического материала было исследовано 18 образцов крови и 17 образцов аспириата эндометрия. Четыре женщины страдали миомой матки, девять пациенток имели диагноз наружный гениталь-

ный эндометриоз. Контрольную группу составили пять здоровых женщин той же возрастной категории (32–42 года). Все женщины были информированы о предстоящих исследованиях и дали свое согласие на участие.

Аспират эндометрия получали на 18–20 день менструального цикла. До 3 мл полученной ткани помещали в пробирку с 100 ЕД гепарина натрия в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Периферическую кровь из вены для иммунологического исследования брали натощак от 8 до 10 часов утра. В течение 1,5 часа при температуре 37 °С биологический материал доставляли в лаборатории иммунологии и молекулярной биологии.

Аспират последовательно механически измельчали и гомогенизировали путем пропускания через шприцы с уменьшающимся объемом через иглы нисходящего диаметра. Затем из полученного гомогената эндометрия выделялась фракция мононуклеаров: гомогенат аккуратно наслаивался на 2 мл Ficoll-Paque, Amersham, (1,077 г/л) и затем центрифугировался 40 мин. при 450 г (1500 об./мин.). После центрифугирования в градиенте плотности опалесцирующее кольцо мононуклеаров аккуратно с помощью дозатора переносили в сухую чистую пробирку и дополнительно промывали ФСБ (центрифугирование 15 мин. при 450 г (1500 об./мин.)).

Цельную кровь и мононуклеары эндометрия окрашивали 30 мин. в темноте с помощью моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD14, CD(16+56), CD19, CD45, меченых флуорохромами FITC, PE и PerCP/Cy5 (Becton Dickinson, ДАКО) для выявления иммунокомпетентных клеток. Для определения целевых популяций клеток были использованы следующие сочетания моноклональных антител.

1) Периферическая кровь:

- IgG1/IgG2a/CD45 – для контроля неспецифического связывания лимфоцитов с античеловеческими антителами и выделения лимфоцитов;
- CD3/CD19/CD45 – для определения относительного содержания В-лимфоцитов [CD3⁺CD19⁺] и Т-лимфоцитов [CD3⁺CD19⁻];

- CD3/CD4/CD45 – для определения относительного количества Т-хелперов [CD3⁺CD4⁺];
- CD3/CD8/CD45 – для определения относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов [CD3⁺CD8⁺];
- CD3/CD(16+56)/CD45 – для определения относительного количества натуральных киллеров [CD3⁺CD(16+56)⁺] и Т-киллеров [CD3⁺CD(16+56)⁺].

После окрашивания образцов периферической крови производили лизис эритроцитов с использованием гипотонического лизирующего раствора (DAKO Easy Lyse). Для этого в каждую пробирку вносилось по 700 мкл готового раствора, тщательно перемешивали и инкубировали 10–12 мин. в темноте при комнатной температуре.

Затем окрашенные мононуклеарные клетки отмывали от лизированных эритроцитов и несвязавшихся антител двумя последовательными центрифугированиями с раствором Хенкса в течение 5 мин. при 300 г (1000 об./мин.).

2) Аспират эндометрия:

- IgG1/IgG2a/CD45 – для контроля неспецифического связывания лимфоцитов с античеловеческими антителами и выделения лимфоцитов;
- CD3/CD4/CD45 – для определения относительного количества Т-хелперов [CD3⁺CD4⁺];
- CD3/CD8/CD45 – для определения относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов [CD3⁺CD8⁺];
- CD3/CD(16+56)/CD45. – для определения относительного количества натуральных киллеров [CD3⁺CD(16+56)⁺] и Т-киллеров [CD3⁺CD(16+56)⁺].

В дальнейшем образцы были готовы к анализу с помощью проточного цитофлюориметра. Полученные данные обрабатывались с помощью статистического пакета Statistica 6.0. Данные подвергались обработке с помощью описательной статистики. Для выбора критерия оценки достоверности различий была произведена оценка нормальности распределения. Достоверность различий определялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных эндометриозом и миомой матки по сравнению с группой контроля содержание всех Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) было достоверно снижено ($p < 0,05$). Снижение содержания Т-лимфоцитов преимущественно было снижено за счет уменьшения относительного количества Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺). Группа контроля и группа больных эндометриозом достоверно отличаются по наличию циркулирующих Т-хелперов ($p < 0,05$). Оказались достоверными различия по относительному количеству Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) между группами больных миомой матки и эндометриозом ($p < 0,05$).

Достоверных отличий в субпопуляционном составе лимфоцитов аспирата эндометрия больных эндомет-

риозом и здоровых женщин выявлено не было. При изучении субпопуляционного состава аспирата эндометрия выявлена тенденция к различию по относительному содержанию CD8⁺ лимфоцитов между группами больных миомой матки и контроля ($p < 0,1$).

Иммунорегуляторные индексы аспирата эндометрия составили у группы контроля – $0,96 \pm 0,13$, у женщин больных эндометриозом – $2,52 \pm 0,21$, у женщин, больных миомой матки – $1,87 \pm 0,64$. Выявлена тенденция к различию значения иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 между группами больных миомой матки и эндометриозом ($p < 0,1$).

Метод проточной цитометрии позволяет получать сопоставимые данные о субпопуляционном составе нескольких биологических материалов одного пациента.

Достоверных различий по исследуемым субпопуляциям в аспирате эндометрия по сравнению с периферической кровью как у группы здоровых женщин, так и среди больных миомой матки обнаружено не было. У больных эндометриозом выявлено достоверное увеличение относительного содержания Т-киллеров CD3⁺CD(16+56)⁺ в аспирате эндометрия по сравнению с периферической кровью ($p < 0,02$).

ВЫВОДЫ

1) У больных эндометриозом и миомой матки в периферической крови относительное содержание Т-лимфоцитов CD3⁺ снижено по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

2) У больных эндометриозом в периферической крови относительное содержание Т-хелперов CD3⁺CD4⁺ снижено по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

3) У женщин больных эндометриозом относительное содержание Т-киллеров CD3⁺CD(16+56)⁺ в аспирате эндометрия по сравнению с периферической кровью увеличено ($p < 0,02$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лесков В.П., Гаврилова Е.Ф., Пищулин А.А. Изменения иммунной системы при внутреннем эндометриозе // Проблемы репродукции. 1998. № 4. С. 26–30.
2. Татарчук Т.Ф., Чернышов В.П., Исламова А.О. Половые стероидные гормоны и иммунная система // Эндокринная гинекология. Киев: Заповіт, 2003. С. 181–199.
3. Сидорова И.С., Мамедбекова Р.Б. Клинико-морфологические особенности простой и пролиферирующей миомы матки // Миома матки. М.: МИА, 2002. С. 127–143.
4. Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Посисеева Л.В. и др. Особенности системного и локального иммунного ответа у женщин с различными формами эндометриоза // Клиническая иммунология. 2004. № 4. С. 242–245.
5. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тулицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. Тверь: Триада, 2005.
6. Зуева Е.Е. Проточная цитометрия. Анализ изображения. Получение и представление данных // Российский биомедицинский журнал. 2005. Т. 4, № 131. С. 465–470.

Поступила в редакцию 20 августа 2007 г.