

# ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ, ИМЕЮЩИХ ВЫСОКИЕ УРОВНИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

*М.В. Униговская, С.Н. Теплова, Б.И. Медведев, Е.А. Иванов  
ЧелГМА, г. Челябинск*

Обследовано 108 пациенток с бесплодием, из них 74 с высоким уровнем антиспермальных антител в крови, 34 – с низким. Контрольную группу составили 23 здоровых женщины. У пациенток с высоким уровнем антиспермальных антител (АСАТ) выявлено повышение содержания IgA, IgM, IgG в сыворотке, а также рост абсолютного числа CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, что может свидетельствовать о поликлональной активации гуморального и клеточного иммунитета. Для этой группы в сравнении с группой 2 характерен более высокий уровень sFas в сыворотке при отсутствии отличий по другим показателям апоптоза.

*Ключевые слова: антиспермальные антитела, бесплодие, IgA, IgM, IgG, CD маркеры лимфоцитов, апоптоз лимфоцитов, sFas, sFasL.*

**Актуальность.** Общая частота бесплодного брака колеблется от 10 до 20 %, частота женского бесплодия составляет 47,5–53,5 % [4]. Одной из форм иммунологического бесплодия являются состояния, характеризующиеся наличием высоких уровней антиспермальных антител в сыворотке крови пациентов. Данная форма женского бесплодия встречается у 9–36 % нефертильных пар [6]. Антиспермальные антитела, взаимодействуя в жидкостях женского репродуктивного тракта со сперматозоидами, вызывают нарушение их подвижности, а также блокируют мембранные молекулы, необходимые для взаимодействия с яйцеклеткой [2]. Возможно также участие антиспермальных антител в запуске иммунологических механизмов, повреждающих оболочку сперматозоидов.

Современные авторы выделяют ряд факторов, способствующих повышенной выработке антиспермальных антител. К ним относят хронические воспалительные заболевания половых органов, инфекции, передающиеся половым путем, генитальный эндометриоз, отягощенный аллергологический анамнез [1]. Вместе с тем нет ясного представления о механизмах реализации влияния этих факторов на развитие антиспермального иммунитета. Придается большое значение нарушению процессов иммунологической толерантности – «неотвечаемости» на некоторые антигены, что сопровождается активацией клонов лимфоцитов, продуцирующих антиспермальные антитела. В норме элиминацию подобных клонов лимфоцитов, возможно, осуществляют процессы апоптоза. В то же время существует явный дефицит работ, посвященных оценке состояния гуморального и клеточного звена иммунной системы, а также программированной ги-

бели лимфоцитов у пациенток с повышенными уровнями антиспермальных антител.

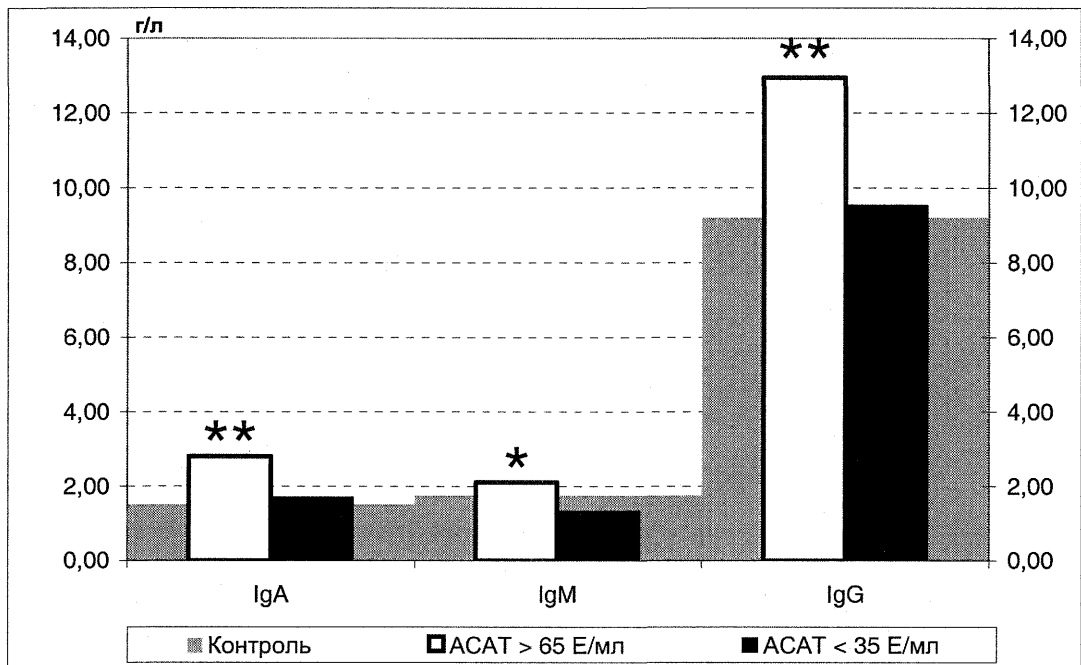
**Целью** исследования является оценка гуморального иммунитета, популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов, процессов апоптоза у пациенток с бесплодием, сочетающимся с высокими уровнями антиспермальных антител.

**Материалы и методы.** Обследовано 108 пациенток с бесплодием (первичным или вторичным). Контрольную группу составили 23 соматически здоровых женщин фертильного возраста, не имеющих патологии репродуктивной системы. Пациентки с бесплодием были разделены на 2 группы: с высоким уровнем антиспермальных антител (> 65,00 Е/мл) – 74 женщины и с низким уровнем (0–35,00 Е/мл) – 34 женщины. Критерием исключения были промежуточные уровни антиспермальных антител (от 36,00 до 65,00 Е/мл) в сыворотке крови пациенток.

У пациенток, составляющих 1-ю группу, первичное бесплодие регистрировалось в 51,4 % случаев (38 женщин), вторичное бесплодие в 48,6 % (36 женщин). Во 2-й группе пациенток с первичным бесплодием было 19 (55,9 %), а имеющих вторичное бесплодие – 15 (44,1 %). Следовательно, соотношение первичного и вторичного бесплодия в обследуемых группах практически не отличалось.

По социальному составу пациентки всех трех групп были сопоставимы. Они не имели достоверных отличий по возрасту. Медиана возраста в первой группе составила 28 лет (квартили 26–32), во второй 29 лет (квартили 27–33), в группе контроля – также 29 лет (квартили 26–31).

Для обнаружения антиспермальных антител в сыворотке крови использовали иммуноферментный



Медианы уровней IgA, IgM, IgG в сыворотке крови пациенток с бесплодием на фоне высокого и низкого содержания антиспермальных антител в сопоставлении с группой контроля: \* – достоверное отличие от группы [ACAT < 35 Е/мл]; \*\* – достоверное отличие от группы [ACAT < 35 Е/мл] и от группы контроля

метод (тест-система Sperm-antibody-elisa, Bioserv, Германия). Сывороточные уровни иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG определяли иммуноферментным методом с помощью тест-системы «Иммуноскрин – G, M, A – ИФА – БЕСТ», производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Популяционный спектр лимфоцитов оценивали путем CD-типирования непрямым иммунофлуоресцентным методом с использованием мышиных моноклональных антител к соответствующим антигенам человека, а также меченых ФИТЦ Fab-фрагментов кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (НПО «Препарат», Н. Новгород). Определяли общее число лейкоцитов периферической крови, процент и абсолютное число лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), Т-цитотоксических (CD8<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD22<sup>+</sup>), NK-клеток (CD16<sup>+</sup>), а также лимфоцитов с маркерами активации CD25, CD71, HLA-DR и готовности к апоптозу – CD95.

Апоптоз лимфоцитов периферической крови изучали морфологически путем подсчета лимфоцитов с фрагментацией ядра при люминесцентной микроскопии мононуклеаров, окрашенных суправитальным ядерным красителем Hoechst 33342 (Boehringer Mannheim).

Имуноферментным методом с помощью тест-систем Bender Medsystems (Austria) определяли в сыворотке крови уровень растворимых рецепторов, регулирующих апоптоз клеток: ингибитора апоптоза sFas (растворимого CD95/Fas/Apo-1) и проапоптогенного фактора sFasL (растворимого Fas-лиганда).

## Статистическая обработка результатов

Данные были обработаны с использованием пакета программ Statistica 6.0. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей – нижнего и верхнего (QL–QU). Достоверность отличий сопоставляемых групп оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, позволяющего работать с данными независимо от вида их распределения (значимыми считали отличия при  $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ проводили по Спирмену.

## Результаты исследования и их обсуждение.

Увеличение уровня антиспермальных антител в сыворотке крови пациенток с бесплодием может отражать как проявление специфического иммунного ответа против спермальных антигенов, так и общее изменение антителопродукции вследствие нарушения функции гуморального звена иммунной системы. Для общей оценки гуморального иммунного ответа мы провели сопоставление уровней сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G у обследованных женщин (см. рисунок).

Как следует из рисунка, у женщин с бесплодием, имеющих высокие уровни антиспермальных антител, достоверно увеличено содержание всех анализируемых классов иммуноглобулинов в сыворотке крови, что может свидетельствовать о поликлональной активации В-лимфоцитов.

Были обнаружены отличия в популяционном составе лимфоцитов (табл. 1).

Как следует из табл. 1, у пациенток с бесплодием, сочетающимся с гиперпродукцией антиспермальных антител, в сопоставлении с пациентками,

имеющими низкие их уровни, увеличено абсолютное число лимфоцитов периферической крови и число CD4<sup>+</sup> клеток (Т-хелперов). Кроме того, у них наблюдается увеличение абсолютного числа лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации – CD25 и HLA-DR, что в целом свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета.

Апоптоз лимфоцитов – один из важных меха-

низмов поддержания иммунного гомеостаза. Как следует из табл. 2, наиболее выраженные изменения программированной гибели лимфоцитов выявлены у пациенток 1-й группы, которая достоверно отличалась от контрольной группы здоровых женщин более высокой численностью клеток с готовностью к апоптозу (CD95<sup>+</sup>), повышенным числом лимфоцитов с морфологическими призна-

Таблица 1

Характеристика популяционного спектра лимфоцитов обследуемых пациенток

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Достоверность отличий между группами (p) согласно тесту Манна-Уитни		
	Высокий уровень АСАТ+ бесплодие	Низкий уровень АСАТ+ бесплодие	Здоровые (контроль)	1-2	1-3	2-3
	Me QL–QU	Me QL–QU	Me QL–QU			
АСАТ	79,42 70,70–96,00	10,14 6,90–20,25	–	< 0,001	–	–
Лейкоциты	5,45 4,50–6,40	5,00 4,20–5,80	4,80 3,80–5,80	0,086	0,028	0,361
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	1,55 1,17–2,08	1,41 1,05–1,56	1,54 0,91–2,18	0,037	0,406	0,402
CD3, ×10 <sup>9</sup> /л	1,08 0,84–1,47	0,94 0,73–1,14	0,97 0,62–1,43	0,235	0,297	1,000
CD4, ×10 <sup>9</sup> /л	0,65 0,49–0,85	0,53 0,39–0,65	0,55 0,35–0,84	0,046	0,235	0,641
CD8, ×10 <sup>9</sup> /л	0,40 0,32–0,54	0,35 0,29–0,41	0,35 0,21–0,53	0,109	0,183	0,776
CD22, ×10 <sup>9</sup> /л	0,37 0,27–0,52	0,31 0,26–0,38	0,27 0,19–0,43	0,163	0,056	0,649
CD16, ×10 <sup>9</sup> /л	0,31 0,21–0,41	0,25 0,22–0,31	0,23 0,17–0,36	0,124	0,094	0,562
CD25, ×10 <sup>9</sup> /л	0,18 0,15–0,28	0,16 0,13–0,22	0,15 0,09–0,24	0,015	0,027	0,478
CD71, ×10 <sup>9</sup> /л	0,21 0,15–0,33	0,20 0,17–0,29	0,18 0,12–0,29	0,971	0,261	0,366
HLA-DR, ×10 <sup>9</sup> /л	0,33 0,21–0,49	0,25 0,21–0,34	0,29 0,19–0,43	0,028	0,275	0,406

Таблица 2

Данные показателей, характеризующие процессы апоптоза

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Достоверность отличий между группами (p) согласно тесту Манна-Уитни		
	Высокий уровень АСАТ+ бесплодие	Низкий уровень АСАТ+ бесплодие	Здоровые (контроль)	1-2	1-3	2-3
	Me QL–QU	Me QL–QU	Me QL–QU			
CD95, ×10 <sup>9</sup> /л	0,16 0,12–0,21	0,14 0,12–0,18	0,12 0,07–0,17	0,436	0,003	0,028
Лимфоциты с признаками апоптоза – фрагментацией ядер, ×10 <sup>9</sup> /л	0,10 0,07–0,15	0,10 0,05–0,12	0,07 0,04–0,12	0,158	0,016	0,215
sFas, пг/мл	74,51 66,01–79,10	54,37 32,56–72,75	79,03 77,24–84,21	0,041	0,197	0,042
sFasL, нг/мл	0,50 0,42–0,54	0,42 0,34–0,55	0,17 0,14–0,35	0,580	0,003	0,062

ками апоптоза и более высоким уровнем sFasL в сыворотке, что отражает усиление процессов программированной клеточной гибели. Известно, что рост растворимых регуляторных белков при апоптозе может быть связан с протеолитическим отщеплением мембранных рецепторов (Fas, FasL); в ряде случаев образование sFas, sFasL может осуществляться за счет механизма альтернативного сплайсинга [3]. Растворимый sFasL может индуцировать апоптоз путем взаимодействия с мембранным Fas-рецептором [5].

При сопоставлении показателей апоптоза в группах пациенток с высокими и низкими уровнями антиспермальных антител единственным достоверным отличием является более высокое содержание сывороточного sFas в I-й группе (см. табл. 2).

Таким образом, у пациенток с бесплодием с повышенными уровнями антиспермальных антител в сравнении с пациентками, страдающими бесплодием с низкими уровнями этих антител, выявлен рост количества лимфоцитов в крови, признаки их поликлональной активации, увеличение содержания sFas в сыворотке.

### Выводы

1. У пациенток с высокими уровнями антиспермальных антител наблюдается усиление общей антителопродукции, что может отражать активацию гуморального иммунного ответа.

2. Наибольшие изменения популяционного состава лимфоцитов характерны для группы пациенток с повышенным уровнем антиспермальных антител. Установлено увеличение абсолютного

числа лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации (CD25, HLA-DR), количества CD4 лимфоцитов.

3. При бесплодии у пациенток с высокими уровнями антиспермальных антител в сопоставлении с пациентками, имеющими низкие уровни этих антител, отмечается более высокое содержание sFas в сыворотке, при отсутствии отличий по другим показателям апоптоза.

### Литература

1. Кулаков, В.И. *Бесплодный брак* / В.И. Кулаков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 616 с.
2. *Основы клинической иммунологии: пер. с англ.* / Э. Чепель, М. Хейни, С. Мисбах, Н. Сновден. – 5-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 416 с.
3. Теплова, С.Н. *Первичные иммунодефицитные состояния* / С.Н. Теплова, А.Ю. Пицальников. – Екатеринбург: УрО РАН, 2005. – 232 с.
4. Узлова, Т.В. *Этиология, иммунологические аспекты патогенеза, диагностика и лечение трубноперитонеального бесплодия* / Т.В. Узлова. – Челябинск, 2000. – С. 12.
5. Mouawad, R. *Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in advanced melanoma* / R. Mouawad, D. Khayat, C. Soubrane // *Melanoma Res.* – 2000. – V. 10 (5). – P. 461–467.
6. Rajesh, K. Naz. *Modalities for treatment of anti-sperm antibody mediated infertility: novel perspectives* / K. Naz Rajesh // *American Journal of Reproductive Immunology.* – 2004. – P. 390–397.

*Поступила в редакцию 21 февраля 2010 г.*