

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ НУКЛЕОСПЕРМАТА НАТРИЯ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ И ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

С. Н. Прошин¹, Р. И. Глушаков¹, И. В. Семёнова², И. Н. Воробцова²,
Л. А. Сайковская¹, Н. И. Тапильская²

На основании обследования 26 пациенток была показана клиническая эффективность нуклеоспермата натрия в лечении хронического эндометрита у пациенток с неудачными попытками ЭКО (экстракорпоральное оплодотворение), имеющих персистирующую вирусную инфекцию. Материал эктоцервикса, эндоцервикса и эндометрия, полученный методом жидкостной цитологии был подвергнут иммуноцитохимическому исследованию для изучения экспрессии TLR-рецепторов 4-го и 9-го типов. Было выявлено, что после курса нуклеоспермата натрия, проведённого пациенткам, маркеры иммунного воспаления значимо снижались, что достоверно показано с использованием моноклональных антител антигенам, которые экспрессируют NK-клетки и В-лимфоциты ($p < 0,5$). После курса лечения изменялась экспрессия TLR-рецепторов. Снижалась вирусная нагрузка по вирусу папилломы человека, что было подтверждено с использованием “real-time PCR”. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования нуклеоспермата натрия как средства патогенетической терапии у данного контингента больных.

Ключевые слова: нуклеоспермат натрия; шейка матки; эндометрий; TLR-рецепторы

ВВЕДЕНИЕ

Эндометрий матки обладает уникальными свойствами, так как в отличие от большинства клеток взрослого организма он способен восстанавливаться после каждого эндометриального цикла. На протяжении всего менструального цикла в эндометрии человека присутствуют интерлейкин-1 (IL-1), и его рецепторный антагонист, многочисленные факторы роста, включая гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) [4]. Ростовые факторы играют особую роль в подготовке эндометрия к имплантации бластоцисты и формированию плаценты. Так, например, основное действие G-CSF направлено на стимуляцию пролиферации и дифференцировки костномозговых предшественников нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, G-CSF может оказывать иммунорегуляторное действие, влияющее на протекание защитных реакций организма [2]. G-CSF снижает продукцию IFN- γ , а также экспрессию моноцитами другого важнейшего регулятора развития Т-хелперов 1-го типа — IL-12 [7]. В тоже время G-CSF индуцирует синтез IL-4 и IL-10 и

активирует DC-2 дендритные клетки, стимулирующие Т-хелперы 2-го типа. На основании экспериментальных данных G-CSF может считаться не только гемопоэтическим цитокином, но и фактором, обеспечивающим регулирование функций Т-лимфоцитов и всей иммунной системы [8]. Показано, что культивирование эмбрионов в присутствии G-CSF повышает успех имплантации на 40 % [6]. Сообщается об успешной имплантации после лечения G-CSF непосредственно перед переносом эмбрионов у пациенток с патологией эндометрия [9]. Вектор влияния нуклеоспермата натрия на этапы кроветворения сходен с направленностью воздействия G-CSF. При сравнении динамики уровня цитокинов (эпидермальный фактор роста, сосудисто-эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, гранулоцитарно-макрофагальный фактор роста) у пациенток, которым был показан нуклеоспермат натрия, наблюдается плавный, физиологичный выброс цитокинов, вовлеченных в процесс заживления ран [5]. Исследование патологии шейки матки и эндометрия позволило предположить, что вирусная инфекция, поражая женский репродуктивный тракт, нарушает адекватный механизм иммунного ответа на инфекционный агент и создаёт, в тоже время, благоприятную основу для хронической персистенции вирусов и микроорганизмов в женских половых органах. В связи с этим особое значение приобретает поиск

¹ Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

² Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, 194100, Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, 16.

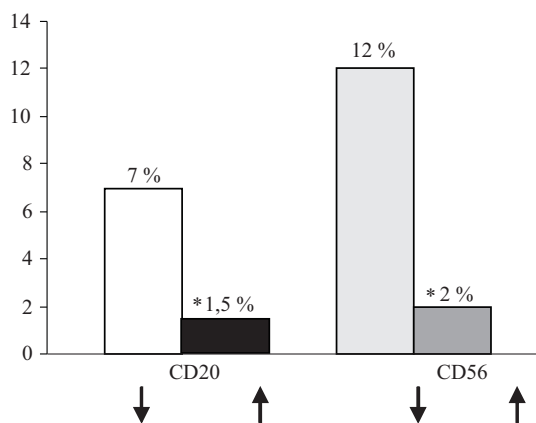


Рис. 1. Частота (%) клеток (над столбцами даны средние), позитивных по антигенам CD20 и CD56 в эндометрии до ↓ и после ↑ лечения нуклеосперматом натрия. * — различие достоверно при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона, Манна-Уитни). Количество пациенток — 26.

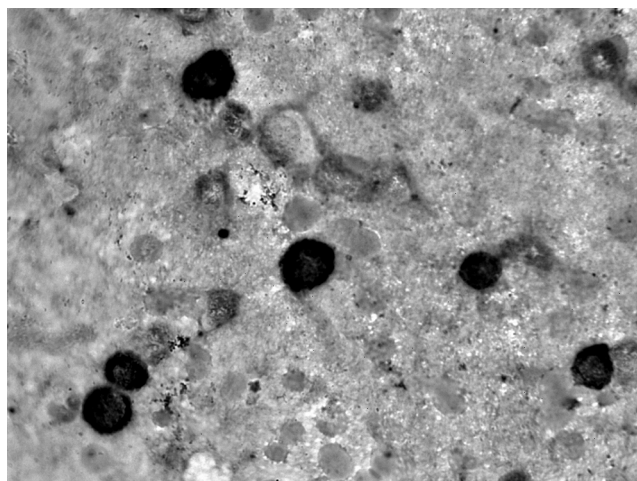


Рис. 2. Клетки, позитивные по антигену CD56. Продукт иммуноцитохимической реакции с моноклональными антителами окрашен в коричневый цвет (см. Методы исследования). Аспират из полости матки. Увеличение $\times 1000$.

фармакологических средств, позволяющих стимулировать противовирусное звено в иммунологической защите организма. К одним из таких средств, несомненно, относится нуклеоспермат натрия, который может быть охарактеризован как препарат с противовирусной активностью, что было убедительно показано в экспериментах *in vitro* при заражении клеточных культур вирусом иммунодефицита человека. В результате проведенных клинических исследований на базе Отделения иммунодефицита Государственного научного центра Института иммунологии было получено разрешение в 2002 г. для использования нуклеоспермата натрия по назначению “Лекарственное средство для комплексной терапии ВИЧ-инфекции” [1]. Убедительно доказано, что клетки синцитиотрофобласта являются основной мишенью для HPV-16 типа, который способен реплицироваться в экстраворсинчатом трофобласте, вызывая апоптоз и тем самым, нарушая процессы инвазии бластоцисты, что, таким образом, формирует прецедент для возникновения первичной плацентарной недостаточности [10, 13]. Более того, персистирующая папилломавирусная инфекция снижает частоту имплантации эмбрионов, что является проблемой для репродуктивных технологий [14]. Нуклеоспермат натрия представляет высокоочищенную фракцию нуклеиновых кислот из клеток молок лососёвых рыб [3] и это позволяет предположить, что противовирусный механизм его действия реализуется через индукцию клетками репродуктивной системы женщин экспрессии рецепторов врождённого иммунитета, которые к настоящему времени известны как toll-like receptors или TLR.

Нами проанализирована иммунологическая и клиническая эффективность нуклеоспермата натрия у пациенток, которые имели в анамнезе неоднократные неудачные попытки ЭКО с морфологическим и иммуноцитохимическим подтверждением хронического эндометрита.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В обследованной группе находилось 26 пациенток с диагнозом: Бесплодие II. Привычное невынашивание беременности. Хронический эндометрит. Персистирующая папилломавирусная инфекция. Пациенткам проводили курс терапии нуклеосперматом натрия в виде ректальных микроклизм в дозе 10 мг/мл, раствора 25 мл 2 раза в неделю в течение двух месяцев.

Материал, взятый с поверхности эктоцервикса, эндоцервикса и аспират из полости матки, наносился на стекло и немедленно подвергался влажной фиксации с помощью фиксатора “BioFix” (Merc). В иммуноцитохимической реакции для верификации клеток, экспрессирующих антигены, известные как CD20 и NCAM/CD56, были использованы мышинные моноклональные антитела — mouse monoclonal anti B cell, CD20 (clone L26) и mouse monoclonal anti CD56 (clone 123C3.D5), соответственно. Оба продукта были получены от компании “Diagnostic BioSystem”. Для верификации клеток, экспрессирующих рецепторы TLR4 (toll-like receptor 4) и TLR9 (toll-like receptor 9), были использованы мышинные моноклональные антитела к антигенам человека — клон 76B357.1 и клон 26C593.2, соответственно. Оба продукта были получены от компании “Lifespan, Biosciences”. Разведения всех первых антител оптимизировались в индивидуальном формате. Инкубация препаратов с первыми антителами проводилась во влажной камере при температуре 37° С в течение получаса. Для визуализации продукта иммуноцитохимической реакции использовали полимерную систему, направленную против первых антител (Anti-Mouse/Rabbit PolyVue HRP Label из набора “PolyVue HRP/DAB Detection System”). Документирование иммуноцитохимического исследования проводили на микроскопе MD125 Leica (Германия).

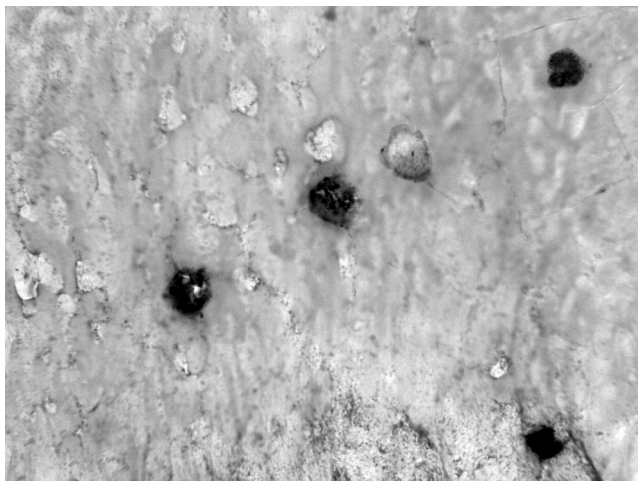


Рис. 3. Клетки, экспрессирующие TLR9. Продукт иммуноцитохимической реакции с моноклональными антителами окрашен в коричневый цвет (см. Методы исследования). Аспират из полости матки. Увеличение $\times 1000$.

Для оценки вирусной нагрузки по ВПЧ (вирус папилломы человека), взятый у пациенток до и после лечения нуклеосперматом-Na материал, исследовали методом — “полимеразная цепная реакция в режиме реального времени” (“Real-time PCR”) в лаборатории микробиологии НИИ акушерства и гинекологии РАМН им. Д. О. Отта (руководитель лаборатории проф. А. М. Савичева). Для статистической обработки полученных результатов был использован критерий Вилкоксона, Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного курса лечения нуклеосперматом натрия произошло значимое снижение вирусной нагрузки определяемой в экзо- и эндоцервиксе методом “полимеразная цепная реакция в режиме реального времени”. Клинический эффект от лечения ознаменован наступлением беременностей в результате ЭКО у 46 % (12) пролеченных пациенток. Все беременности были доношены до срока родов.

Имуноцитохимическое исследование указывает, что у пациенток до лечения нуклеосперматом натрия частота клеток позитивных по антигену CD20 (В-клетки) и клеток позитивных по антигену CD56 (NK-клетки) в среднем составила 7 и 12 %, соответственно (рис. 1). После проведенного курса терапии произошло достоверное снижение в эндометрии частоты В- и NK-клеток. Как видно из рис. 2, иммуноцитохимическая верификация указанных типов клеток не представляет затруднений. В связи с полученными данными представляет несомненный интерес результат относительно изменения экспрессии в ткани репродуктивного тракта женщин toll-like рецепторов (TLR4 и TLR9) (рис. 3). До курса лечения экспрессия как TLR4, так и TLR9 находилась на относительно невысоком уровне, что особенно очевидно для экспрессии

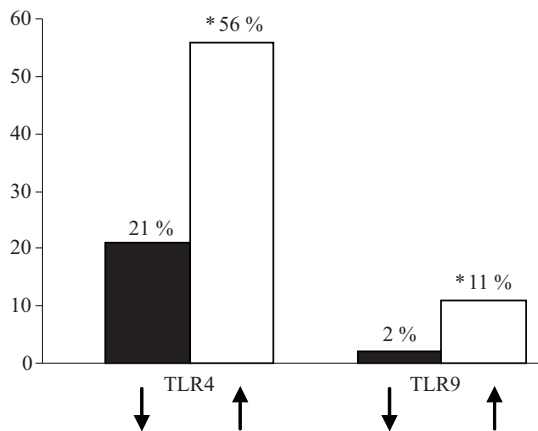


Рис. 4. Частота (%) клеток, позитивных по антигенам TLR4 и TLR9 в эндометрии до ↓ и после ↑ лечения нуклеосперматом натрия. * — различие достоверно при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона, Манн-Уитни). Количество пациенток — 26.

toll-like рецепторов 9-го типа (рис. 4). Применение нуклеоспермата натрия приводило к значимой индукции экспрессии клетками эндометрия указанных типов рецепторов ($p < 0,5$).

Показано, что toll-like рецепторы (TLR) являются центральным звеном врожденного иммунитета. При этом экспрессия определенных типов TLR в различных отделах женского репродуктивного тракта различается [12]. Все TLR различно локализованы в клеточных компартментах. Так, функционально активный TLR4, распознающий патоген-ассоциированные мембранные комплексы (ПАМК или в англоязычной аббревиатуре PAMP) бактерий и клеточных патогенов, экспрессируется на поверхности клеток, а после фагоцитоза патогена продолжают экспрессироваться на мембранах эндосом, где получают дополнительную возможность взаимодействовать с ПАМК после разрушения патогена. Напротив, TLR-9 конститутивно экспрессируется в эндоцитоплазматическом ретикулуме и появляется в эндосомах после активации клеток. В настоящее время описано два принципиально различающихся сигнальных пути после взаимодействия PAMP с TLR: активация раннего противовоспалительного ответа с участием TLR-2, TLR-4, TLR-5 и активация противовирусного и позднего противовоспалительного ответа с участием TLR-3, TLR-4 и TLR-9. Обращает внимание, что TLR-4 является уникальным рецептором одинаково эффективно участвующим в реализации обоих путей клеточной активации. Активация системы врожденного иммунитета вызывает развитие комплекса регулируемых цитокинами провоспалительных реакций, приводящих к уничтожению и элиминации патогена. Затем происходит активация противовоспалительных сигналов нужных для завершения воспаления, что необходимо не только для возврата защитных реакций к нормальному гомеостатическому состоянию, но и для недопущения развития гиперреактивности и повреждения собственных тканей. Актив-

вация TLR не только ведет к синтезу провоспалительных цитокинов и индукции воспаления, но и вызывает усиление продукции противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, IL-13. Необходимость адекватной индукции противовоспалительных цитокинов и поддержания баланса между секретируемыми про- и антипролиферативными цитокинами на этапе имплантации эмбриона и ранних этапов беременности является на сегодняшний день постулатом иммунологии репродукции. В нашем исследовании показано, что в эндометрии у пациенток с персистирующей ВПЧ инфекцией клетки, экспрессирующие TLR9, выявлялись с низкой частотой (см. рис. 4). После курса лечения нуклеосперматом натрия доля клеток позитивных в иммуноцитохимической реакции с моноклональными антителами к toll-like рецепторам 9-го типа достоверно возрастала (в среднем более чем в три раза). Известно, что TLR9 связываются с нуклеиновыми кислотами, содержащими CpG-островки [11]. Интересно отметить, что после курса терапии нуклеосперматом натрия повышение экспрессии TLR9 в эпителии женской репродуктивной системы, надёжно верифицированного с помощью проведённого нами иммуноцитохимического исследования, было ассоциировано со снижением нагрузки по ВПЧ.

ВЫВОД

Нуклеоспермат натрия проявляет иммуномодулирующие свойства в ткани эндометрия, эффективно стимулирует экспрессию toll-like рецепторов клетками репродуктивной системы женщин и может являться

препаратом выбора в коррекции бесплодия и привычного невынашивания беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Асафов, *Применение нуклеоспермата натрия для лечения ВИЧ-инфекции и способы лечения*, Патент РФ № 2206326 (2001).
2. С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. *Цитокины*, "Издательство фолиант", СПб (2008).
3. Л. К. Пашук, Г. Н. Апрышко, Е. М. Трещалина, *Хим.-фарм. журн.*, **29**(6), 61 – 64 (1995).
4. Н. Ю. Сотников, *Иммунологическая загадка беременности*, Изд-во МИК, Иваново (2005).
5. Е. М. Трещалина, М. Б. Бычков, Д. П. Бодягин, *Врач*, № 5, 26 (1996).
6. I. Aderholm, A. Loft, F. Hald, et al., *Reprod. Biomed. Online*, **20**, 477 – 484 (2010).
7. E. Boneberg, L. Hareng, F. Gantner, et al., *Blood*, **95**, 270 – 276 (2000).
8. A. Franzke, *Cytokines Growth Factors Rev.*, **17**, 235 – 244 (2006).
9. N. Gleicher, A. Vidali, D. H. Barad, *Fertil. Steril.*, <http://www.fertstert.org>, (2011).
10. L. M. Gomez, Y. Ma, C. Ho, et al., *Hum. Reprod.*, **23**(3), 709 – 715 (2008).
11. K. M. Hart, A. J. Murphy, K. T. Barrett, et al., *J. Reprod. Immunol.*, **80**(1 – 2), 33 – 40 (2009).
12. M. M. Herbst-Kralovetz, A. J. Quayle, M. Ficarra, et al., *Am. J. Reprod. Immun.*, **59**(3), 212 – 224 (2008).
13. P. L. Hermonat, S. Kechelava, C. L. Lowery, et al., *Hum. Pathol.*, **30**(1), 109 – 111 (1999).
14. S. D. Spandorfer, A. M. Bongiovanni, S. Fasioulotis, et al., *Fertil. Steril.*, **87**(6), 1498 (2007).

Поступила 07.11.12

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF SODIUM NUCLEOSPERMATE IN TREATING CHRONIC ENDOMETRITIS AND INFERTILITY COMPLICATED BY HPV INFECTION

S. N. Proshin¹, R. I. Glushakov¹, I. V. Semenova², I. N. Vorobtsova², L. A. Saikovskaya¹, and N. I. Tapil'skaya²

¹ St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia

² State Pediatric Medical Academy, ul. Kantemirovskaya 16, St. Petersburg, 194100, Russia

Clinical efficacy of sodium nucleospermate (SNS) has shown in the treatment of 26 female patients with chronic endometritis, unsuccessful attempts at *in vitro* fertilization, and persistent viral infection. Cells from endometrium were processed by liquid cytology and studied by immunocytochemistry techniques. It has been clearly established that, after SNS treatment, the frequency of CD20- and CD56-positive cells was significantly decreased ($p < 0.05$) and the frequency of TLR4 and TLR9 expressing cells in endometrium has been significantly improved ($p < 0.05$). In addition, the human papilloma virus (HPV) load was reduced as manifested by the real-time PCR test. The obtained results show good prospects for successful use SNS as a means of pathogenetic therapy in patients with this diagnosis.

Keywords: sodium nucleospermate; cervix of uteri; endometrium; TLR receptors