

Цитокиновый профиль иммунокомпетентных клеток влагалища при хроническом рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе

Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С., Донников А.Е., ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздравсоцразвития России, г. Москва

Cytokine mRNA profiles of immunocompetent vaginal cells of women with chronic recurrent vulvovaginal candidiasis

Burmenskaya O.V., Bayramova G.R., Nepsha O.S., Donnikov A.E.

Резюме

Данная статья посвящена особенностям иммунного ответа при хроническом рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе (ХРВК). Из 76 обследованных женщин репродуктивного возраста, ХРВК выявлен у 34 пациенток. Группу сравнения составили 23 условно-здоровые женщины и 19 пациенток с бактериальным вагинозом (БВ). Описано состояние микрофлоры и проведен анализ профиля экспрессии мРНК генов цитокинов при ХРВК, в норме и при БВ. Показано, что ХРВК сопровождается повышением уровня экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ), а также IL-10 и снижением уровня экспрессии мРНК генов IL-18 и IL-12 α /p35.

Ключевые слова: хронический рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз, профиль экспрессии мРНК генов цитокинов, биоценоз влагалища, ПЦР в режиме реального времени

Summary

The main idea of this study was to describe cytokine profiles of immunological vaginal cells of women with chronic recurrent vulvovaginal candidiasis (CVVC). There were 76 women recruited into the study. Out of them CVVC was verified among 34 women. A control group included 23 relatively healthy women without inflammatory diseases of reproductive system and 19 patients with "classical" bacterial vaginosis (BV). Biocoenosis data and cytokines expressions profile were evaluated in vaginal swabs of women with CVVC, BV and healthy women. It was demonstrated that CVVC was associated with an elevation of cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-10) and the decrease of IL-12 α /p35 and IL-18.

Keywords: chronic recurrent vulvovaginal candidiasis, cytokine mRNA expression profile, vaginal biocoenosis, real-time PCR

Введение

Одной из распространенных оппортунистических инфекций влагалища является вульвовагинальный кандидоз (ВВК), течение которого часто принимает хронический рецидивирующий характер. Следует отметить, что ключевую роль в иммунном ответе при вульвовагинальном кандидозе играют макрофаги и нейтрофилы, обеспечивающие уничтожение возбудителя непосредственно на слизистых оболочках влагалища. Активация полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) приводит к локальной воспалительной реакции, сопровождающейся выбросом провоспалительных цитокинов и, как счита-

ют — многие исследователи, является основным механизмом развития симптомов ВВК [4,6].

Для запуска механизмов адаптивного иммунитета необходима четкая и слаженная работа всех звеньев врожденного иммунитета. Координация этих взаимодействий осуществляется посредством изменения экспрессии цитокинов, что обуславливает интерес к изучению цитокинового профиля при кандидозной инфекции. Предполагается, что хронизация кандидоза может быть обусловлена нарушением иммунологической защиты организма. ПЦР-исследования открыли новые перспективы изучения состояния иммунной системы по уровню экспрессии мРНК генов цитокинов.

Целью настоящего исследования было определение особенностей функционирования цитокиновой системы в иммунокомпетентных клетках влагалища при ХРВК. В данной работе оценку цитокинового профиля проводили по уровню экспрессии мРНК генов цитокинов с помощью ОТ-ПЦР непосредственно в клетках вагинального отделяемого.

Ответственный за ведение переписки -

Бурменская Ольга Владимировна,

Адрес: 117997 Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Тел.: (8-495) 438-22-92

E-mail:bourmenska@mail.ru

Материал и методы

Обследовано 76 женщины репродуктивного возраста от 19 до 46 лет. Средний возраст составил $24,1 \pm 1,3$ года. Всем пациенткам проводилось клиническое, кольпоскопическое исследование, микроскопия мазка по Граму и ПЦР-анализ. По данным клинико-лабораторных методов исследования ХРВК был верифицирован у 34 женщин. На момент обследования у всех пациенток отмечалось обострение эпизода ХРВК, которое было подтверждено данными лабораторных методов исследования - микроскопическим и ПЦР-анализом. У 19 женщин вульвовагинальный кандидоз был выявлен в виде моноинфекции, у 15 - в сочетании с бактериальным вагинозом. Контрольную группу составили 23 клинически здоровые женщины. В группу сравнения ($n=19$) были включены женщины с классическим бактериальным вагинозом.

Исследование микрофлоры влагалища методом ПЦР. Взятие материала (вагинальные соскобы) осуществляли в пробирки с физиологическим раствором. Осаждение клеток и бактериальных агентов проводили путем центрифугирования при 13000 об/мин в течение 10 минут. Полученные клетки ресуспендировали в 100 мкл физ.раствора. Для выделения ДНК использовали сорбцию на сорбенте с использованием коммерческих наборов "Проба ГС" (ДНК-Технология, Россия). Объем образцов после выделения составил 100 мкл.

При количественной оценке биоценоза влагалища («Фемофлор», ДНК-Технология, Россия) учитывалась общая бактериальная масса, масса *Lactobacillus* spp. и 14 основных групп микроорганизмов, представляющих условно-патогенную флору, включая *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*/*Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. и *Candida* spp.

Так же было проведено обследование женщин методом ПЦР на наличие абсолютных патогенов: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*.

Обработка результатов осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения к приборам. Количество микроорганизмов выражали в виде десятичного логарифма (Lg) концентрации генетического материала (геном-эквивалентов в миллилитре, гз/мл).

Исследование профиля мРНК цитокинов IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-18, IL-12 α /p35, IL-10, IFN- γ , TGF- β 1, LIF, а также общего лейкоцитарного антигена CD45 проводили методом ОТ-ПЦР.

Во избежание деградации РНК взятие материала (вагинальные соскобы) осуществляли в пробирки с раствором гуанидинтиоционата (лизирующий раствор наборы "Проба НК" (ДНК-Технология, Россия). Осаждение РНК проводили изопропанолом в присутствии соосадителя, с последующими отмытками промывочными растворами. Объем образцов после выделения составил 50 мкл.

Для оценки экспрессии использовались коммерческие реактивы (ДНК-Технология, Россия). Производитель гарантировал отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК цитокинов и нормировочных генов. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой.

Реакцию обратной транскрипции ставили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 5 раз в ТЕ-буфере.

Амплификацию осуществляли в режиме "реального времени" в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл - 80°C 30 сек, 94°C 1 мин 30 сек; 50 циклов - 94°C 20 сек, 62°C 20 сек; 10°C - хранение 94°C на приборе "ДТ-964".

Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 62°C по каналу FAM. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки. Нормировка проводилась по пяти референсным генам HPRT1, TBP, B2M, GUSB, ABL.

Оценка уровня экспрессии проводилась методом сравнения индикаторных циклов (метод $\Delta\Delta Cq$). При статистической обработке данных в качестве меры центральной тенденции количественных признаков выбрана медиана (Me), а в качестве интервальной оценки - верхний (L) и нижний квартили (H), т.к. исследуемые выборки не подчиняются закону нормального распределения. Результаты представлены (таб.1) в виде Me (L-H). Для оценки значимости межгрупповых различий применялся U-критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей.

Результаты и обсуждение

По данным ПЦР-анализа у всех женщин отсутствовали абсолютные патогены: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*.

Большинство пациенток 28 из 34 (82,3%) с диагностированным ХРВК предъявляли жалобы на зуд во влагалище. При этом зуд в области вульвы и периаанальной области отмечен у 20 (58,8%) женщин; выделения из половых путей - у 19 (55,9%) пациенток; жжение в области наружных половых органов - у 13 (38,2%); дизурические расстройства - у 15 (44,1%) пациенток.

Данные сбора анамнеза показали, что у 29 (85%) пациенток с ХРВК эпизоды ВВК отмечались 4-5 раз в год, у 3 (8,8%) женщин - 6-8 раз в год, у 2 (5,9%) женщин - ежемесячные обострения эпизодов ВВК. Давность заболевания колебалась от 1 до 8 лет (средняя продолжительность 3,3 года).

При опросе пациенток лишь 21 из 34 женщин связывали обострение ВВК с фазой менструального цикла. При этом у 14 пациенток обострение наступало непосредственно перед началом менструаций, а у 7 - сразу после окончания менструаций.

Все пациентки с ХРВК были обследованы в момент

Таблица 1. Профиль экспрессии мРНК генов цитокинов в клетках вагинальных соскобов относительно контрольной группы.

	IFN- γ	IL-1 β	TNF- α	IL-6	LIF	IL-8	IL-10	TGF- β 1	IL-12 α	IL-18	CD45
ХРВК	3,4** (1,8 – 10,5)	8,0*** (2,9 – 12,0)	2,7** (1,3 – 6,0)	127* (14 – 475)	4,5 (0,8 – 15)	3,8** (1,8 – 8,1)	2,9*** (1,3 – 3,9)	1,3 (1,0 – 2,1)	0,38** (0,09–0,62)	0,24*** (0,09 – 0,37)	3,0** (1,5 – 4,8)
ХРВК + БВ	4,9* (1,4-21,4)	5,1* (3,0 – 11,1)	1,6* (1,1 – 4,3)	111* (0 – 1300)	1,9 (0,3 – 22)	6,9** (2,6 – 13,4)	2,3** (1,9 – 3,6)	1,1 (0,7 – 4,3)	0,33** (0,14 – 0,80)	0,15*** (0,09 – 0,38)	2,6* (1,4 – 4,4)
БВ	2,5 (0,8 – 3,5)	3,0 (0,8 – 7,3)	0,7 (0,4 – 1,9)	554*** (83 – 880)	12,4** (5,9 – 21)	3,0 (0,8 – 8,2)	2,0** (1,3 – 6,0)	0,7 (0,6 – 3,8)	0,22*** (0,05 – 0,54)	0,16*** (0,04 – 0,32)	2,3 (0,5 – 3,5)
Контроль	1 (0 – 2,4)	1 (0,6 – 2,4)	1 (0,7 – 1,4)	1 (0 – 23)	1 (0 – 7,3)	1,0 (0,3 – 3)	1 (0,3 – 2)	1 (0,8 – 1,7)	1 (0,65 – 1,36)	1 (0,65 – 1,23)	1 (0,5 – 1,9)

Уровень значимости различий по отношению к контрольной группе: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

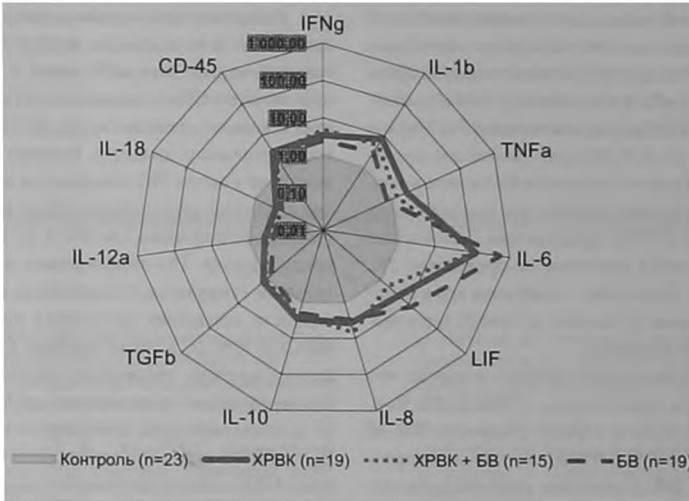


Рис.1. Профиль экспрессии мРНК генов иммунной системы при дисбиозах различного генеза

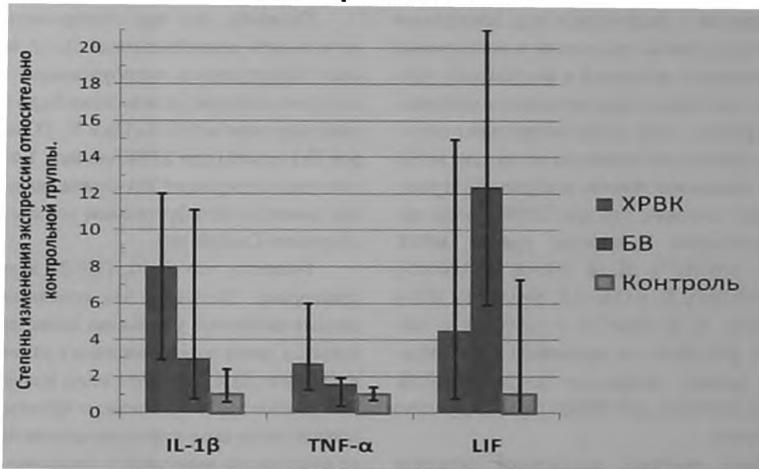


Рис.2. Уровень экспрессии мРНК генов IL-1β, TNF-α и LIF при БВ и ХРБК в виде моноинфекции

обострения: при гинекологическом осмотре у всех пациенток отмечалась гиперемия и отек слизистой оболочки влагалища, шейки матки и вульвы, которые имели разную степень выраженности.

По результатам исследования биоценоза влагалища у пациенток с ХРБК в виде моноинфекции при наличии *Candida* spp. большая часть бактериальной массы (>90%) была представлена *Lactobacillus* spp., количество условных патогенов не превышало 5%, *Ureaplasma* spp. выявлена у 6 (32%) пациенток, только в одном случае количество *Ureaplasma* spp. было более 5 Lg гз/мл.

По результатам исследования биоценоза влагалища пациенток с сочетанием ХРБК и БВ количество лактобактерий у 9 (60%) женщин было резко снижено (менее 20% от общей бактериальной массы), количество

условно-патогенных микроорганизмов во всех случаях было более 10%, *Ureaplasma* spp. выявлена у 9 (60%) пациенток в количестве более 5 Lg гз/мл.

Условно-патогенная флора представлена в основном анаэробами (*Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Atopobium vaginae*, *Lachnobacterium* spp.)

Группу сравнения составили 19 пациенток с бактериальным вагинозом.

У 18 (94,7%) женщин основной жалобой были: обильные гомогенные выделения из половых путей, у 16 (84,2%) пациенток с неприятным запахом. В группе сравнения (БВ) признаков воспалительной реакции со стороны влагалища и вульвы выявлено не было. По результатам теста «Фемофлор» в данной группе у пациенток

было снижено количество лактобактерий по отношению к общей бактериальной массе, доля условно-патогенной микрофлоры по отношению к общей бактериальной массе составила более 10%. У 14 (74%) пациенток обнаружена *Ureaplasma spp.*, из них в половине случаев в количестве более 5 Lg гз/мл. *M. hominis* выявлена у 3 (16%) пациенток.

Количественная оценка состояния биоценоза в контрольной группе влагалища показала, что большая часть бактериальной массы (>90%) представлена *Lactobacillus spp.*, количество условных патогенов не превышало 7%. У 5 (22%) пациенток обнаружена *Ureaplasma spp.* в количестве менее 5,0 Lg гз/мл, *M. hominis* и *Candida spp.* в значимых количествах не выявлены.

Исследование цитокинового профиля показало, что в наибольшей степени представлены мРНК IL-1 β , IL-8, IL-18, TGF- β 1, CD45, далее в порядке убывания: TNF- α , IL-10, IL-12 α , LIF, IL-6, IFN- γ . В ряде случаев по экспрессии IL-12 α , LIF, IL-6, IFN- γ получены отрицательные результаты.

Значения уровня экспрессии мРНК генов цитокинов и CD45 в исследуемых группах представлены в таблице 3. Профиль экспрессии в графическом виде представлен на рис.1. Поскольку уровень экспрессии в исследуемых группах был нормирован на таковой в контрольной группе, то Me уровня экспрессии генов цитокинов в контрольной группе была равна 1, а Me уровня экспрессии в исследуемых группах отражала во сколько раз экспрессия мРНК генов цитокинов превышала таковую контрольной группе.

Исследование показало, что при ХРВК в виде моноинфекции достоверно повышены уровни мРНК TNF- α (Me=2,7, p=0,0027), IL-1 β (Me=8, p=0,00005), IL-6 (Me=127, p=0,015), IL-8 (Me=3,8, p=0,0061), IFN- γ (Me=3,4, p=0,0099), IL-10 (Me=2,9, p=0,00056), а также CD45 (Me=3, p=0,0040) по сравнению с контрольной группой; а уровень экспрессии IL-12 α (Me=0,38, p=0,0030) и IL-18 (Me=0,24, p=0,000005) был достоверно ниже, чем в контроле.

При БВ было отмечено достоверное снижение уровня экспрессии IL-12 α (Me=0,22, p=0,00054) и IL-18 (Me=0,16, p=0,000031) и достоверное повышение IL-6 (Me=554, p=0,00037), IL-10 (Me=2, p=0,0047), а также LIF (Me=12,4, p=0,0041) по сравнению с контрольной группой.

При сочетании ХРВК с БВ определен идентичный ХРВК в виде моноинфекции профиль экспрессии генов цитокинов. При ХРВК в сочетании с БВ достоверно были повышены уровни мРНК TNF- α (Me=1,6, p=0,048), IL-1 β (Me=5,1, p=0,0013), IL-6 (Me=111, p=0,045), IL-8 (Me=6,9, p=0,0036), IFN- γ (Me=4,9, p=0,013), IL-10 (Me=2,3, p=0,0023), а также CD45 (Me=2,6, p=0,015) по сравнению с контрольной группой; а уровень экспрессии IL-12 α (Me=0,33, p=0,0055) и IL-18 (Me=0,15, p=0,000046) был достоверно ниже, чем в контроле.

Различий по уровню экспрессии TGF- β 1 между группами не отмечено. При сравнении БВ с ХРВК в виде моноинфекции (рис.2) отмечено, что при БВ уровень экспрессии мРНК IL-1 β (p=0,032), TNF- α (p=0,0058) достоверно ниже, а повышение IL-6 (в 4,4 раза) и LIF - более су-

щественно, чем при ХРВК.

Поскольку при вагинитах повышается содержание лейкоцитов в вагинальных мазках, был выбран универсальный маркер всех лейкоцитов – общий лейкоцитарный антиген CD45, повышение уровня мРНК данного гена в данном случае могло свидетельствовать о наличии воспалительного процесса. Помимо этого, принимая во внимание участие Th1-лимфоцитов в защитных реакциях при кандидозе целесообразно было посмотреть такие регуляторные цитокины, как IFN- γ , IL-18, IL-12 α /p35. IFN- γ продуцируется Th1-лимфоцитами и является наиболее сильным стимулятором макрофагов (микробцидной активности, продукции цитокинов), повышает экспрессию МНСI и МНСII, а также молекул адгезии на эндотелиальных клетках, увеличивая проницаемость эндотелия. Он ограничивает размножение гриба на ранних стадиях кандидоинфекции, стимулирует иммунный ответ [1]. При ХРВК в виде моноинфекции и при ХРВК в сочетании с БВ мы видели достоверное повышение уровня данного цитокина в сравнении с контрольной группой. Очевидно, что повышение IFN- γ можно считать благоприятным маркером при ХРВК.

Показано, что при экспериментальном кандидозе у мышей рекомбинантный IL-12 значительно повышает эффективность антифунгальной терапии [1]. Вместе с тем, в нашем исследовании было показано, что уровень экспрессии мРНК IL-12 α и IL-18 (основных индукторов Th1-ответа) при ХРВК снижен. Возможно, что недостаточная стимуляция Th1-ответа является одной из причин снижения антифунгальной защиты и приводит к персистенции *Candida spp.*

Известно, что IL-10, TGF- β 1 являются иммуносупрессорами. Полагают, что основными продуцентами данных цитокинов у человека являются Т-регуляторные клетки, а также поляризованные к развитию по М2с-пути макрофаги [3]. Существует точка зрения, что диссеминация *Candida spp.* в организме и хронизация процесса сопровождается иммунорегуляторными изменениями в звене адаптивного иммунитета, связанными с повышением IL-10 и TGF- β 1 [2]. В нашем исследовании выявлена высокая экспрессия мРНК TGF- β 1, однако отличий от контрольной группы не обнаружено.

Вместе с тем уровень мРНК IL-10 был достоверно выше и при ХРВК, и при БВ, по сравнению с пациентками контрольной группы, что согласуется с данными литературы [5, 7].

Таким образом, при ХРВК очень важен баланс провоспалительных и иммуносупрессорных цитокинов. Провоспалительные цитокины обеспечивают развитие и полноценное функционирование всех стадий иммунных реакций против *Candida spp.*, а противовоспалительные цитокины сдерживают чрезмерную активность воспалительного процесса и не дают ему перейти в разряд патологических. Хорошо известный пример чрезмерной активности воспалительного процесса, сопровождающегося высокими концентрациями провоспалительных цитокинов, приводящий к серьезному повреждению тканей суставов – это ревматоидный артрит.

Профиль экспрессии мРНК цитокинов при дисбиозах различного генеза очень близкий, тем не менее, при БВ выше синтез мРНК IL-6 по сравнению с ХРВК (4,4 раза) и LIF (2 раза), а синтез IL-1 β и TNF- α достоверно ниже. По-видимому, БВ не сопровождается такой активацией макрофагального звена иммунного ответа, как ХРВК.

Выводы

Таким образом, исходя из полученных результатов можно полагать, что для оценки воспалительного процесса при ХРВК наиболее показательны следующие цитокины: IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-18, IL-12 α /p35, IL-10, IFN- γ и CD45. Профиль экспрессии генов цитокинов при ХРВК и БВ различается по уровню экспрессии генов LIF, IL-6, IL-1 β и TNF- α . ■

Литература:

1. Лебедева Т.Н. Иммуитет при кандидозе (обзор). Проблемы медицинской микологии. 2004;6(4):8-16.
2. Шабашова Н.В. Иммунодефициты при хроническом кандидозе кожи и слизистых оболочек. Проблемы медицинской микологии. 2009;11(1): 3-10.
3. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol. 2008; 181(6): 3733-3739.
4. Fidel P.L.Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. Am J Reprod Immunol. 2007; 57(1): 2-12.
5. Lilic D., Gravenor I., Robson N. et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Infect Immun. 2003; 71(10): 5690-5699.
6. Steele C., Fidel P.L.Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. Infect Immun. 2002; 70(2): 577-583.
7. Yasodhara P., Raghunath M., Sreeramulu D et al. Local immunity in Indian women with bacterial vaginosis. J Reprod Immunol. 2006;70(1-2): 133-41.