

Содержание цитокинов в вагинальном отделяемом у женщин в I триместре беременности и состояние биоценоза влагалища

Хаютин Л.В., медицинский центр «Гармония», г. Екатеринбург; Плотко Е.Э., к.м.н., ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия медицинский центр «Гармония», г. Екатеринбург; Е.С. Ворошилина, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития, Медицинский центр «Гармония», г. Екатеринбург

The content of cytokines in the vaginal fluid and vaginal biocenosis in pregnant women I trimester

Khayutin L.V., Plotko E.E., Voroshilina E.S.

Резюме

Изучены количественный и качественный состав микрофлоры влагалища и уровни цитокинов в вагинальном отделяемом у 89 беременных в I триместре. Установлены различия в частоте обнаружения и количественном содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в зависимости от типа биоценоза влагалища. Сделан вывод о необходимости дальнейших исследований местного иммунитета с целью выявления пациенток, нуждающихся в проведении иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: беременность, биоценоз влагалища, цитокины, местный иммунитет

Summary

Quantitative and qualitative microbial composition and content of cytokine in vaginal fluid were studied in 89 pregnant women in I trimester. Levels and quantity of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines varied upon the type of biocenosis. Further investigation of local vaginal immunity is necessary in order to determine patients in need for immunocorrection.

Keywords: regnancy, vaginal biocenosis, cytokine, local immunity

Введение

Вагинальная микрофлора является индикатором состояния здоровья женщины, представляя собой динамическую систему, реагирующую на изменения гормонального и иммунологического статусов при различных патологических состояниях. По данным эпидемиологических исследований в настоящее время в структуре инфекционно-воспалительных заболеваний женской репродуктивной сферы преобладают воспалительные процессы, этиологическим фактором которых выступают условно-патогенные бактерии и грибы, являющиеся составной частью нормальной микрофлоры. Отсутствие специфической картины воспаления, торпидное, а зачастую бессимптомное течение осложняют диагностику этих заболеваний, что спо-

собствует хронизации процесса, неблагоприятно влияет на репродуктивную функцию, снижает качество жизни (3, 4, 5). Выделение условно-патогенной микрофлоры из патологического материала еще не является доказательством её этиологической роли. Только учет количественных соотношений отдельных видов микроорганизмов в составе микроценоза может характеризовать состояние вагинального содержимого и степень его нарушения (2). Развитие воспалительного процесса во влагалище зависит не только от состояния микрофлоры, но и от характера местного иммунного ответа.

Центральную роль в регуляции иммунного ответа играют цитокины — большая группа растворимых факторов межмолекулярного взаимодействия, в которую входят интерфероны, интерлейкины, ростовые факторы. Цитокины — это экстрацеллюлярные протенины, формирующие сеть коммуникативных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей (6, 7). В настоящее время о системе цитокинов сложилось представление как о сложной взаиморегулируемой сети, каждый компонент которой может дублировать, дополнять, усиливать или подавлять действие других цитокинов (7).

Ответственный за ведение переписки -
Ворошилина Екатерина Сергеевна
620026, Екатеринбург, ул. Тверитина 16,
медицинский центр «Гармония»
Тел. (343) 251-08-75,
e-mail: voroshilina@gmail.com

Определение уровня цитокинов в вагинальном отделяемом представляет интерес с точки зрения оценки характера и интенсивности местного иммунного ответа организма женщины в зависимости от качественного и количественного состава биоценоза влагалища.

Цель исследования: изучить зависимость состояния биоценоза влагалища и содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в вагинальном отделяемом у беременных в I триместре.

Материалы и методы

В исследование включены 89 беременных в сроках от 4 до 12 недель, обратившиеся в Медицинский центр «Гармония» для вынашивания или прерывания беременности в период в 2010 году. Средний возраст пациенток составил $27,8 \pm 0,6$ лет. Из них 55 женщин планировали вынашивать беременность, а 34 избрали один из методов её прерывания.

Было проведено определение уровня цитокинов и количественный состав микрофлоры влагалища у всех женщин. Материал для исследования количественного состава микрофлоры влагалища собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Исследование биоценоза влагалища проводили методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием реагентов Фемофлор (ООО «НПО ДНК-Технология») в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология»). Классификацию вариантов биоценоза осуществляли в соответствии с ранее предложенным алгоритмом (1).

Для определения количественного содержания цитокинов в вагинальном отделяемом получали смыв с влагалища стерильным изотоническим раствором в объеме 5 мл. Полученный материал центрифугировали при 3000 об/минуту, для исследования использовали надосадочную жидкость. Уровень цитокинов IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-a, IFN-g, IgAs, TNF-a определяли методом твердофазного ИФА с использованием тест систем ЗАО «Вектор

БЕСТ» (г. Новосибирск). При получении значения оптической плотности исследуемой пробы меньше оптической плотности стандарта с нулевым значением считали уровень цитокина в пробе недетектируемым (менее 0).

В соответствии с целью исследования, а так же по результатам количественного анализа биоценоза влагалища, пациентки были разделены на три группы: группа I – 41 пациентка, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям абсолютного нормоценоза; группа II – 35 пациентка, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям относительного нормоценоза; группа III – 13 пациенток, состояние биоценоза которых соответствовало критериям умеренного или выраженного дисбиоза.

Результаты исследования были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики и представлены в виде средней арифметической и её стандартной ошибки ($M \pm m$). При анализе количественных признаков оценку достоверности различий между группами производили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Использованный нами метод ИФА позволил установить, что статистически значимые различия в частоте обнаружения и количественном содержании в вагинальном отделяемом были выявлены для следующих цитокинов: IL-1B, TNF-a, IL-10. В некоторых пробах содержание ряда цитокинов было недетектируемым (табл. 1).

Провоспалительный цитокин IL-1B статистически значимо чаще выявляли у пациенток с дисбиотическими нарушениями вагинальной микрофлоры (группа III) по сравнению с женщинами, состояние биоценоза которых соответствовало критерию абсолютного нормоценоза (группа I): 92,3% и 51,2% соответственно. Напротив, провоспалительный цитокин TNF-a достоверно чаще выявляли у пациенток группы I по сравнению с группами II и III (70,7%, 40,0% и 23,1% соответственно). Частота выявления противовоспалительного цитокина IL-10 была выше у пациенток группы I по сравнению с группами II и III (78,0%, 42,9% и 38,5% соответственно). Интерлейкины IL-4, IL-6, IFN-a, IFN-g, IgAs выявляли менее, чем у половины обследованных беременных, причем различия между группами были статистически не значимы.

Таблица 1. Частота выявления детектируемых уровней цитокинов в вагинальном отделяемом у беременных I триместра в зависимости от состояния биоценоза влагалища.

	IL-1B	IL4	IL6	IL10	IFN-a	IFN-g	IgAs	TNF-a
Группа I	51,2%	26,8%	17,1%	78,0%	7,3%	26,8%	36,6%	70,7%
Группа II	74,3%	25,7%	25,7%	42,9%	5,7%	14,3%	51,4%	40,0%
Группа III	92,3%	23,1%	23,1%	38,5%	15,4%	46,2%	38,5%	23,1%
	$P_{1-3} < 0,01$	$P > 0,05$	$P_{1-3} > 0,05$	$P_{1-3} < 0,01$ $P_{1-2} < 0,01$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P_{1-3} < 0,01$ $P_{1-2} < 0,01$

Таблица 2. Уровни цитокинов вагинального отделяемого у беременных первого триместра в зависимости от состояния биоценоза влагалища

	I группа	II группа	III группа	Достоверность различий
IL-1B (пг/мл)	11,84±2,00	70,30±18,26	25,46±7,04	P _{1,2} < 0,01 P _{2,3} < 0,05
IL-4 (пг/мл)	0,37±0,11	0,36±0,06	0,17±0,09	P > 0,05
IL-6 (пг/мл)	0,91±0,41	5,46±2,41	5,77±3,35	P > 0,05
IL-10 (пг/мл)	1,42±0,21	0,92±0,14	0,75±0,22	P _{1,3} < 0,05
IFN-α (пг/мл)	15,08±1,74	8,27±2,10	11,13±1,21	P > 0,05
IFN-γ (пг/мл)	5,95±1,33	13,81±1,75	2,84±1,06	P _{1,2} < 0,001 P _{2,3} < 0,001
IgAs (мг/мл)	0,20±0,07	0,11±0,03	0,27±0,07	P > 0,05
TNF-α (пг/мл)	0,76±0,15	0,72±0,15	1,19±0,41	P _{1,3} < 0,05 P _{2,3} < 0,05

В таблице 2 представлены данные о количественном содержании цитокинов в вагинальном отделяемом у обследованных беременных.

Установлено что у женщин с уреоплазменной инфекцией при наличии сохранной нормофлоры (группа II) уровень провоспалительного IL-1B статистически значимо выше, чем у женщин как с абсолютным нормоценозом (группа I), так и с дисбиозом вагинальной микрофлоры (группа III). У пациенток группы III уровень IL-1B был более, чем в 2 раза выше по сравнению с женщинами группы I. с абсолютным нормоценозом, однако различия оказались статистически недостоверными. Уровень провоспалительного цитокина TNF-α был статистически значимо выше у пациенток с дисбиозом влагалища по сравнению с женщинами, у которых при исследовании биоценоза влагалища выявляли нормоценоз.

Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 был статистически значимо выше у беременных с абсолютным нормоценозом по сравнению с беременными, у которых выявляли дисбиоз. Содержание TNF-γ оказалось самым высоким у женщин с относительным нормоценозом, обусловленным присутствием *Ureaplasma spp.*, в сравнении женщинами группы I (абсолютный нормоценоз) и группы III (дисбиоз вагинальной микрофлоры).

Уровни IL-4, IL-6, IFN-α и IgAs в вагинальном отделяемом существенно не зависели от состояния биоценоза влагалища.

Таким образом, у беременных, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям абсолютного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%, *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.* в количестве менее 10⁴ ГЭ/мл), в вагинальном отделяемом чаще определяли IL-10 и TNF-α. Причем уровень IL-10 был более высоким по сравнению с беременными других групп, что согласует-

ся с представлениями о том, что здоровый женский генитальный тракт имеет Th-2 – иммунную среду, в которой доминирует IL – 10 (8). Уровень TNF-α был ниже, чем у пациенток с дисбиозом.

В вагинальном отделяемом пациенток, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям относительного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%, *Ureaplasma spp.* и *Candida spp.* в количестве более 10⁴ ГЭ/мл), IL-1B выявляли чаще, а IL-10 и TNF-α реже, чем у беременных с абсолютным нормоценозом. Учитывая, что уровень IL-1B у пациенток II группы был значительно выше, чем у беременных других групп, следует предполагать, что повышение содержания этого цитокина в вагинальном отделяемом является результатом реагирования местного иммунитета на инфекционный агент - *Ureaplasma spp.* У беременных этой группы также определяли более высокий уровень IFN-γ. В то же время, у части женщин с уреоплазменной инфекцией не были выявлены детектируемые уровни провоспалительных цитокинов, что может свидетельствовать о вариабельности индивидуальных иммунных реакций на внедрение данного патогенна.

У женщин, состояние вагинальной микрофлоры которых характеризуется как дисбиоз, в 92,3% случаев выявляли IL-1B, при этом уровень IL-1B в два раза превышал таковой у беременных с абсолютным нормоценозом. При выявлении TNF-α в вагинальном отделяемом беременных с дисбиозом определяли и более высокие значения этого цитокина. Учитывая, что все случаи дисбиотических нарушений среди обследованных были связаны с доминированием облигатных анаэробов, полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований о состоянии местного иммунитета при бактериальном вагинозе (8). Низкий уровень IL-10 и IFN-γ

в вагинальном отделяемом беременных с дисбиозом может препятствовать поддержанию равновесия между нормофлорой и условно-патогенными микроорганизмами, входящими в состав биоценоза влагалища.

Выводы

В целом, частота обнаружения и уровни основных про- и противовоспалительных цитокинов различались в зависимости от состояния биоценоза влагалища. Однако

у части беременных с вагинальным дисбиозом выявлена неадекватная реакция местного иммунитета на нарушения влагалищной микрофлоры. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований местного иммунитета с целью выявления пациентов, нуждающихся в проведении иммунокорректирующей терапии. Одним из направлений исследования может являться выявление генетических факторов, детерминирующих характер местного иммунного ответа. ■

Литература:

1. Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С., Донников А.Е., Плотнок Е.Э., Байрамова Г.Р. Особенности биоценоза влагалища у женщин с нормальным и промежуточным типом мазка по результатам ПЦР-РВ, Акушерство и гинекология, 2011, №1, с 66-70.
2. Прилепская В.Н., Анкирская А.С., Муравьева В.В. и др. Препарат "Тиберал" в лечении бактериального вагиноза. Гинекология. 2006; 8 (4).
3. Амбулаторно-поликлиническая помощь в гинекологии / Под редакцией В.А. Бенюка. – К.: Издат. дом «Здоровье Украины». – 2007. – 512 с.
4. Hillier S.L., Holmes K.K. Bacterial vaginosis // In: Holmes K.K., Mardh P.A., Sparling P.F., Wiesener P.J. eds. Sexually transmitted diseases. 2nd. New York: McGraw-Hill 1999, 547-560.
5. Mead P.B. Epidemiology of bacterial vaginosis // Am. J. Obstet. Gynecology. 2001, 169: 2, 446-449.
6. Кетлинский С.А. Современные аспекты изучения цитокинов // 2й съезд иммунологов России: ввод. лекции, тез. докл. – Сочи 1999 – С.46 -52
7. Симбирцев А.С. Биология семейства интерлейкина 1 человека. Журнал акушерство и гинекология 1998 - №3. – С. 7 - 17
8. Behbahani H., Walther - Jallow L. Klareskog E. et al. Proinflamm cytokine expression in cervical mucosa during HIV-1 and human infection // J Acquir. Immune Defic. Syndr. – 2007 vol 45
9. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунология беременности. М; 2003