

Полиморфизм генов системы цитокинов и колонизация урогенитального тракта женщин репродуктивного возраста уреаплазмами

Ворошилина Е.С., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития, г. Екатеринбург; **Сергеев А.Г.**, д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития, г. Екатеринбург; **Тумбинская Л.В.**, к.б.н, заместитель генерального директора по развитию ЗАО «НПО ДНК-Технология», г. Москва

Cytokine gene polymorphism and Ureaplasma urogenital colonization in women of reproductive age

Voroshilina E.S., Sergeev A.G., Tumbinskaya L.V.

Резюме

С целью изучения взаимосвязи между генетическими особенностями иммунной системы пациенток и колонизацией их урогенитального тракта уреаплазмами были обследованы 85 женщин репродуктивного возраста, состояние биоценоза которых соответствовало критериям нормоценоза, у 47 женщин влагалище было колонизировано *Ureaplasma* spp.. Типирование полиморфизмов генов, ассоциированных с системой провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени на реагентах и оборудовании производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Москва). Была выявлена корреляция между носительством «провоспалительного» генотипа с абсолютным нормоценозом, «противовоспалительного» генотипа — с присутствием *Ureaplasma* spp. в количестве более 10^4 ГЭ/мл. Отсутствие субъективных признаков патологии влагалища у пациенток при наличии *Ureaplasma* spp. в количестве более 10^4 ГЭ/мл достоверно чаще сочеталось с «противовоспалительным» генотипом организма-хозяина.

Ключевые слова: биоценоз влагалища, *Ureaplasma* spp., цитокины, ПЦР в реальном времени, полиморфизм генов

Summary

In order to find out correlation between *Ureaplasma* urogenital colonization in women and their genetic specificity of immune system 85 women of reproductive age which vaginal biocenosis was described as normal were included into the study. Cytokine gene polymorphisms were detected by real-time PCR, test-systems and equipment NPO DNA-Technology. "Pro-inflammatory" genotype correlated with absolute normocenosis, while "anti-inflammatory" genotype — with persistence of *Ureaplasma* spp. in quantity $> 10^4$ GE/ml. The absence of subjective signs of vaginal pathology in women with *Ureaplasma* persistence correlated with host "pro-inflammatory" genotype.

Key words: vaginal biocenosis, *Ureaplasma* spp., cytokine, real-time PCR, gene polymorphism

Введение

Взаимодействие человека с множеством окружающих его условно-патогенных и патогенных микроорганизмов является нормой существования макроорганизма и при определенных условиях переходит в зону ответственности врачей-клиницистов. Одним из вопросов, по которому постоянно ведутся дискуссии между

акушерами-гинекологами, дерматовенерологами, специалистами по ЭКО, является персистенция уреаплазм во влагалище здоровых женщин. Нуждается ли это состояние в лечении, если оно не вызывает жалоб пациентки, а врач не видит выраженной клинической картины?

Группа молликутов, как патогенных для человека микроорганизмов, известна более 100 лет, в урогенитальном тракте женщин эти микроорганизмы лабораторными методами идентифицируются более полувека, но до сих пор врачи не могут найти четкого ответа на вопрос — надо ли их элиминировать из мочеполовой системы и насколько эффективным окажется предложенное пациентке лечение?

И если раньше все усилия клиницистов, и, как следствие, врачей лабораторной диагностики были направле-

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

ны на выявление и количественную оценку «микро» - составляющей системы «патоген-хозяин», то в настоящее время, с появлением новых знаний о функционировании макроорганизма и его генетических особенностях, пристальное внимание врачей приковано к организму хозяина. Практическая медицина все большее внимание уделяет тем свойствам организма человека, которые позволили бы определить норму реакции пациента при взаимодействии с различными инфекционными агентами, решить вопрос о необходимости назначения терапии, а также спрогнозировать эффективность предлагаемого лечения. Становится очевидным, что на современном этапе развития медицины невозможно рассматривать инфекционный процесс без отрыва от свойств макроорганизма, в котором он развивается.

Персистенция уреаплазм в мочеполовой системе реализуется в условиях поддержания определенного уровня цитокинов в крови и вагинальном секрете [6, 7]. Установлено, что повышение уровня цитокинов (в том числе IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8 и TNF-a) связано с проявлением клинических признаков, обусловленных наличием в урогенитальном тракте *Ureaplasma spp.* [6, 7]. Причина изменения уровня цитокинов остается неясной. Важную роль в этом могут играть как нарушения функционирования иммунной системы (в том числе обусловленные влиянием генетических факторов), так и биохимические изменения, вызванные присутствием уреаплазм. Накоплены многочисленные данные о зависимости экспрессии цитокинов от генетической вариабельности кодирующих их генов [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Обнаружена корреляция между носительством различных полиморфизмов генов цитокинов и особенностями течения ряда инфекций. Однако возможное влияние аллельных вариантов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на особенности персистенции уреаплазм в мочеполовой системе практически не изучено. Полиморфизмы, расположенные в промоторных, регуляторных и кодирующих областях генов (ответственных за измененную экспрессию и продукцию соответствующего белка), кодирующих ряд известных про- и противовоспалительных цитокинов, могут приводить к дисбалансу воспалительного и противои инфекционного иммунного ответа. В зависимости от конкретного набора полиморфизмов, ассоциированных с повышенной и пониженной продукцией про- и противовоспалительных цитокинов, принимающих участие в регуляции иммунного ответа, эффективность этого ответа может значительно варьировать на индивидуальном уровне. Так, например, преобладание в генотипе аллелей, ассоциированных с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-18, TNFa, IFNg), приводит к формированию так называемого «провоспалительного генотипа». И, напротив, «противовоспалительный генотип», формируется за счет аллелей ассоциированных с повышенной продукцией противовоспалительных цитокинов (IL-1Ra, IL-4, IL-10) [1, 2].

Цель исследования – изучить взаимосвязь между генетическими особенностями иммунной системы паци-

ентов и колонизацией их урогенитального тракта уреаплазмами.

Материалы и методы

В исследование были включены 85 женщин репродуктивного возраста (18–45 лет, средний возраст 29,3 года). Критерии включения: биоценоз влагалища с сохраненной нормофлорой (абсолютный или относительный нормоценоз) по результатам исследования методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (набор реагентов Фемофлор 16, ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва). Критерии исключения: наличие ВИЧ, сифилиса, облигатно-патогенных микроорганизмов из числа ИППП (*C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoea*, *M. genitalium*), местная или системная антимикробная или антимикотическая терапия в течение 4-х предшествовавших исследованию недель.

Выделение ДНК из венозной крови проводили с помощью комплекта реагентов ПРОБА-Рapid-Генетика (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Типирование полиморфизмов генов, ассоциированных с системой провоспалительных (IL-1A(-889 C>T), IL-1B(+3953 C>T), IL-1R1(PstI1970)) и противовоспалительных (IL-1RN(11100 msp1), IL-4(-33 C>T), IL-10(-592 A>C)) цитокинов, проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени на реагентах и оборудовании производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Москва). Индивидуальную оценку воспалительного генотипа проводили комплексно с учетом потенциального взаимодействия всех определяемых аллельных вариантов генов. Заключение о наличии «провоспалительного» генотипа ставили в случае преобладания полиморфизмов в генах провоспалительных цитокинов (IL-1A, IL-1B и IL-1R1), «противовоспалительного генотипа» — в случае преобладания полиморфизмов в генах противовоспалительных цитокинов (IL-1RN, IL-4, IL-10). Сбалансированным генотипом считали вариант, в котором полиморфизмы перечисленных генов либо отсутствовали совсем, либо количество полиморфизмов в генах про- и противовоспалительных цитокинов было одинаковым.

Статистическую обработку данных проводили с помощью свободно распространяемого продукта WINPEPI версия 9.7 и SPSS 17.0 для Windows. Для определения связи между параметрами рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r). Статистическую достоверность различий между группами рассчитывали при помощи стандартной четырехпольной таблицы, достоверность оценивали при уровне значимости 0,05 и 0,01.

Результаты и обсуждение

По данным ПЦР-ПВ у всех обследованных женщин выявили нормоценоз – вариант биоценоза влагалища с долей нормофлоры более 80% в его составе. В зависимости от наличия и количества *Ureaplasma spp.* все женщины были разделены на 3 группы. В группу I вошла 31 женщина, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям абсолютного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%), а *Ureaplasma spp.* отсутство-

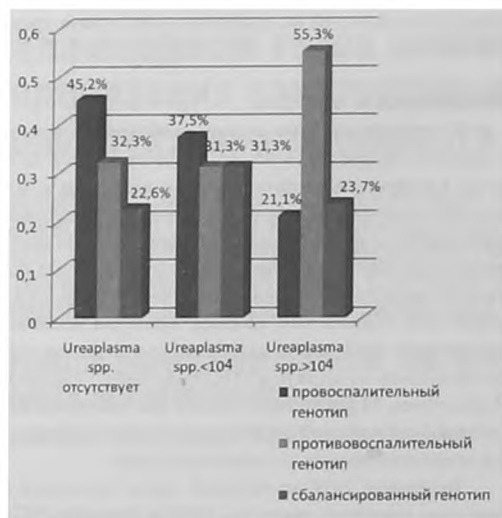


Рис. 1. Характеристика воспалительных генотипов у женщин с нормоценозом вагинальной микрофлоры в зависимости от наличия и количества *Ureaplasma* spp.



Рис. 2. Структура воспалительных генотипов у пациенток группы III в зависимости от наличия или отсутствия объективных признаков патологии влагалища (n=38)

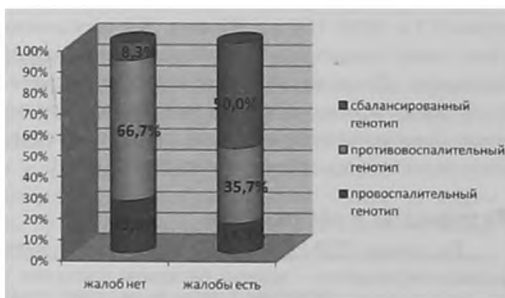


Рис. 3. Структура воспалительных генотипов у пациенток группы III в зависимости от наличия субъективных признаков патологии влагалища (n=38)

вала. В группу II вошли 16 женщин, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям абсолютного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%), *Ureaplasma* spp. присутствовала в количестве менее 10⁴ ГЭ/мл. В группу III вошли 38 женщин, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям относительного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%, *Ureaplasma* spp. в количестве более 10⁴ ГЭ/мл).

Характеристика воспалительных генотипов у пациенток в зависимости от наличия и количества уреоплазм в составе биоценоза влагалища представлена на рис. 1.

«Противовоспалительный» генотип чаще всего определяли у женщин группы I (с абсолютным нормоценозом при условии отсутствия уреоплазм), несколько реже – у женщин группы II (уреоплазмы присутствовали в количестве менее 10⁴ ГЭ/мл. У пациенток группы III (*Ureaplasma* spp. более 10⁴ ГЭ/мл) «провоспалительный» генотип выявляли в 2 раза реже, чем у женщин группы I (p=0,03; OR=3,0 1,09–8,72).

«Противовоспалительный» генотип у женщин групп I и II встречался практически с равной частотой (32,3% и 31,3% соответственно), в то время как у пациенток группы III «противовоспалительный» генотип определяли в 55,3% случаев. Различия по этому показателю между женщинами с абсолютным нормоценозом (группа I+II) и относительным нормоценозом статистически достоверны (p=0,038; OR=2,64, 1,1–6,32). Частота определения сбалансированного генотипа статистически значимо не различалась между группами.

Корреляционный анализ позволил установить связь между отсутствием уреоплазм в биоценозе и наличием «провоспалительного» генотипа, «противовоспалительный» генотип напротив коррелировал с присутствием уреоплазм в количестве более 10⁴ ГЭ/мл (r=0,225, при p=0,031). Таким образом наличие «провоспалительного» генотипа является защитным фактором, который контролирует количество уреоплазм в составе вагинального биоценоза и возможно способствует элиминации этого микроорганизма из влагалища. «Противовоспалительный» вероятно определяет пониженную способность организма хозяина к борьбе с микробами-оппортунистами, каковыми являются уреоплазмы.

Для оценки влияния воспалительного генотипа на клиническое течение уреоплазменной инфекции провели анализ структуры генотипов у пациенток группы III (с *Ureaplasma* spp. более 10⁴ ГЭ/мл) в зависимости от наличия или отсутствия объективных и субъективных признаков патологии влагалища.

Субъективные признаки патологии влагалища (жалобы на зуд, жжение, патологические бели) имели место у 14 (36,8%) из 38 женщин, объективные признаки патологии влагалища (гиперемия слизистой, патологические выделения) отмечали у 15 (39,5%) из 38 пациенток. Таким образом, клинически здоровыми на основании клинко-лабораторных признаков являлись 18 (47,4%) из 38 женщин, 20 (52,6%) из 38 пациенток имели клинические (субъективные или объективные) и/или микроскопические признаки патологии влагалища.

«Провоспалительный» генотип в 2 раза чаще встречался у тех пациенток, у которых врач не видел признаков патологии влагалища, сбалансированный генотип напротив в 2 раза реже определяли у этой категории женщин (рис. 2), однако статистически значимых различий не выявили. Частота выявления «противовоспалительного» генотипа практически не различалась в зависимости от наличия или отсутствия клиники патологии влагалища.

«Провоспалительный» генотип в чаще определяли у пациенток, которые считали себя здоровыми (рис. 3), статистически значимые различия отсутствовали. Примечательно, что частота выявления «противовоспалительного» генотипа была статистически значимо выше у этой категории женщин ($p=0,049$; $OR=3,6$, $0,94-13,77$). Сбалансированный генотип напротив статистически значимо чаще встречался у женщин, которые предъявляли жалобы ($p=0,003$; $OR=11,0$, $1,93-6,66$). Корреляционный анализ обнаружил связь между носительством сбалансированного генотипа и наличием жалоб у пациенток с персистирующей уреаплазменной инфекцией ($r=0,393$ при $p=0,015$). Таким образом отсутствие жалоб у пациенток при наличии *Ureaplasma spp.* более 10^4 ГЭ/мл во влагалище указывает на сдвиг в сторону противовоспалительных реакций местного иммунного ответа и неспособность организма хозяина адекватно бороться с уреаплазменной инфекцией. Результатом такой бессимптомной инфекции может явиться развитие осложнений, влияющих на репродуктивную функцию женщины. Полученные результаты вновь подтверждают необходимость индивидуаль-

ность подхода при решении вопроса о назначении терапии пациенткам с уреаплазменной инфекцией при отсутствии у них клинических проявлений патологии влагалища.

Выводы

1. У женщин, имеющих полиморфизмы в генах провоспалительных цитокинов («провоспалительный» генотип), более чем в 80% случаев состояние влагалищной микрофлоры характеризуется как абсолютный нормоценоз, в то время как в группе пациенток с «противовоспалительным» генотипом достоверно чаще во влагалищном биоценозе присутствует *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл.

2. Отсутствие субъективных признаков патологии влагалища у пациенток при наличии *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл достоверно чаще сочеталось с «противовоспалительным» генотипом организма хозяина, что может свидетельствовать в пользу относительной толерантности местного иммунитета к персистентной инфекции.

3. В группе пациенток, состояние биоценоза влагалища которых соответствовало критериям относительного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%, *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл), субъективные признаки патологии влагалища достоверно чаще имели место у носителей «сбалансированного» генотипа, когда количество полиморфизмов в генах про- и противовоспалительных цитокинов было одинаковым. ■

Литература:

1. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т.4, №2. — С.3-12.
2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т.3, №2. — С.16-22.
3. Asensi V, Alvarez V, Valle E, Meana A, Ficer J, Coto E, Carton JA, Maradona JA, Paz J, Dieguez MA, de la Fuente B, Moreno A, Rubio S, Tuya MJ, Sarasua J, Llamas S, Arribas JM. 2003. IL-1 alpha (-889) pro-moter polymorphism is a risk factor for osteomyelitis. *Am J Med Genet A* 119:132-36.
4. Babula O, Lazdane G, Kroica J, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. 2005. Frequency of interleukin-4 (IL-4) — 589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannosyl-binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* 40(9):1258-62.
5. Balding J, Healy CM, Livingstone WJ, White B, Mynett-Johnson L, Cafferkey M, Smith OP. 2003. Genomic polymorphic profiles in an Irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity. *Genes Immun* 4(8):533-40.
6. Ouberg S. Immunogenetics of inflammation and infection in the gastrointestinal and urogenital tracts // Mijdrecht, Nederland, 2006.
7. Reyes L, Reinhard M, Brown MB. 2009. Different inflammatory responses are associated with *Ureaplasma parvum*-induced UTI and urolith formation. *BMC Infectious Diseases* 2009, 9:9 doi:10.1186/1471-2334-9-9
8. Thompson SR, Humphries SE. 2007. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes Immun* 8 (2): 91-99.