

## НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ ВЛАГАЛИЩА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ

Подгорная А.В., Махмутходжаев А.Ш., Кох Л.И., Михеенко Г.А., Юрьев С.Ю.

*ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», Томск, e-mail: an\_podgornaya@mail.ru*

Ведение беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом представляет сложную проблему. В качестве одной из главных причин рецидивирующего течения заболевания рассматривается несостоятельность защитных механизмов влагалища. Цель настоящего исследования заключалась в изучении особенностей неспецифического иммунитета влагалища у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом в период ремиссии. В исследование включены 80 беременных женщин в сроке гестации  $14,8 \pm 2,0$  нед. Основную группу составили 40 пациенток с рецидивирующим бактериальным вагинозом. В контрольную группу вошли 40 здоровых женщин в период гестации. В обеих группах женщин осуществляли анализ клинических и лабораторных характеристик биоценоза, качественного и количественного состава влагалищной флоры, определяли содержание  $\beta$ -дефензина-2 (HBD-2), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-10 (ИЛ-10), интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) в смывах из влагалища. Женщинам основной группы проводилось профилактическое лечение препаратом рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b в дозе 250 000 МЕ в виде интравагинальных суппозиторий 2 раза в день 10 дней и через 2 недели после окончания лечения повторяли оценку характеристик неспецифического иммунитета влагалища. В результате исследования было выявлено, что у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом существует повышенный риск развития обострения заболевания за счет сохранения умеренного дисбиоза влагалища, преобладания *Lactobacillus iners* в сочетании с увеличением относительного содержания отдельных видов анаэробных микроорганизмов и снижением продукции цитокинов и антимикробных пептидов. Профилактическое лечение беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом рекомбинантным человеческим интерфероном альфа-2b оказывает модулирующее влияние на неспецифический иммунитет влагалища усиливая выработку HBD-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$  и способствуя увеличению содержания лактобактерий, что может быть использовано при лечении пациенток с рецидивирующим бактериальным вагинозом.

Ключевые слова: рецидивирующий бактериальный вагиноз, беременность, неспецифический иммунитет, лактобактерии, антимикробные пептиды, цитокины.

## THE VAGINAL INNATE IMMUNITY OF PREGNANT WOMEN WITH RECURRENT BACTERIAL VAGINOSIS

Podgornaya A.V., Makhmutkhodzhaev A.Sh., Kokh L.I., Mikheenko G.A., Yuriev S.Yu.

*Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: an\_podgornaya@mail.ru*

The management of pregnant women with recurrent bacterial vaginosis is a complex and important problem. The dysfunction of the vaginal innate immunity is a main reason of recurrent bacterial vaginosis. The purpose of this research was to study the characteristics of vaginal innate immunity among pregnant women with recurrent bacterial vaginosis. The study included 80 pregnant women in gestational age  $14,8 \pm 2,0$  weeks. The main group consisted of 40 patients with recurrent bacterial vaginosis. The control group included 40 healthy pregnant women. We analyzed clinical and laboratory criteria of bacterial vaginosis, a qualitative and quantitative characteristics of the vaginal flora, the vaginal level of  $\beta$ -defensin-2 (HBD-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). The women of the main group received prophylactic treatment with intravaginal suppositories of 250 000 ME human recombinant interferon alfa-2b two times a day for 10 days. It was revealed that the pregnant women with recurrent bacterial vaginosis had a moderate vaginal dysbiosis, a predominance of *Lactobacillus iners* with a growth of anaerobic microorganisms and a decrease of cytokines and antimicrobial peptides. This changes can increase risk of repeated cases of the disease. The prophylactic treatment of pregnant women with recurrent bacterial vaginosis with recombinant human interferon alfa-2b affected on the vaginal innate immunity by enhancing the production of HBD-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  and lactobacillus. It can be used in treatment patients with recurrent bacterial vaginosis.

Keywords: recurrent bacterial vaginosis, pregnancy, innate immunity, lactobacillus, antimicrobial peptides, cytokines.

Бактериальный вагиноз (БВ) во время беременности является не только основной причиной нарушения биоценоза женского репродуктивного тракта, но и может приводить к развитию таких осложнений беременности, как преждевременные роды, преждевременный разрыв плодных оболочек, хориоамнионит, внутриутробное инфицирование, рождение детей с низкой массой тела [1, 3, 4, 5].

Основной причиной рецидивирующего течения бактериального вагиноза является недостаточность функции неспецифического иммунитета влагалища, в частности его антимикробного, цитокинового и бактериального звеньев [10,11,12]. Являясь самостоятельными компонентами общей системы, они, в то же время, способны взаимодействовать между собой, повышая эффективность защиты организма при внедрении патогена [2, 6]. Бактериальное звено, представленное лактобациллами, играет важную роль в поддержании нормального биоценоза половых путей женщины, и создает условия для адекватного функционирования неспецифического иммунитета влагалища [7, 8, 9].

Ведение беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом представляет особую проблему. В настоящее время отсутствуют обоснованные методы противорецидивного лечения данного заболевания у женщин в период гестации, что, возможно, обусловлено недостаточностью знаний о причинах возникновения повторных эпизодов вагиноза. Разработка таких методов является актуальной задачей современного акушерства, поскольку способствует оптимизации тактики ведения пациенток и улучшению перинатальных исходов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей неспецифического иммунитета влагалища у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом.

### **Материал и методы исследования**

В исследование были включены 80 беременных женщин в сроке гестации 14,8±2,0 нед (от 13 до 20 нед), которые составили две группы наблюдения. В основную группу вошли 40 пациенток с рецидивирующим бактериальным вагинозом в период ремиссии, с наличием, как минимум, двух эпизодов бактериального вагиноза за истекший период гестации. Здоровые беременные женщины (n=40) составили контрольную группу наблюдения. В исследование не включались беременные женщины с наличием инфекционно-воспалительных заболеваний нижнего отдела репродуктивного тракта другой этиологии, в числе которых заболевания передающиеся половым путем, кандидоз, аэробные вагиниты.

Забор материала для лабораторного исследования осуществляли на этапе включения. В основной группе контрольный анализ проводили спустя 2 недели после профилактического лечения, с использованием препарата рекомбинантного человеческого

интерферона альфа-2b (Генферон Лайт), применяемого по 1 суппозиторию (250 000 МЕ) интравагинально 2 раза в день в течение 10 дней.

Проводили анализ клинических и лабораторных характеристик биоценоза, качественного и количественного состава влагалищной флоры, определение содержания  $\beta$ -дефензина-2 (HBD-2), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-10 (ИЛ-10), интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) в смывах из влагалища. Количественную и качественную оценку микрофлоры влагалища осуществляли методом полимеразной цепной реакции. Содержание микроорганизмов выражали в виде десятичного логарифма абсолютного количества ДНК. Относительное количество отдельных видов бактерий вычисляли как логарифм отношения определяемого микроорганизма к величине общей бактериальной массы (ОБМ). Состояние нормоценоза определялось содержанием лактобактерий. При этом логарифм содержания лактобактерий в значениях от 0 до -0,1 расценивали как состояние нормоценоза. Величины от -0,1 до -0,7 соответствовали состоянию умеренного дисбиоза, показатели менее -0,8 характеризовали состояние выраженного дисбиоза. Содержание анаэробов в значениях менее -2 расценивалось как доля этих бактерий в ОБМ менее 1 %. Величины от -2 до -1, от -1 до -0,4, и от -0,4 и выше указывало на долю анаэробов в ОБМ 1–10 %, 10–40 % и более 40 % соответственно.

Определение уровня HBD-2 и цитокинов проводили с помощью иммуноферментного анализа наборами ELISA и Bender MedSystems (БиоХимМак) по рекомендуемой производителями методике.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионной программы Statistica 8,0 (StatSoft). Использовались методы описательной статистики с вычислением центральных тенденций и их размаха для количественных переменных, процентной доли признака для качественных данных. Результаты выражали в виде медианы и интерквартильного интервала, среднего арифметического, его стандартного отклонения и в процентах. Для сравнения исследуемых групп по количественным переменным применяли непараметрический критерий Манна – Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для зависимых групп. По качественным признакам группы сопоставляли с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и их обсуждение**

Беременные женщины, вошедшие в исследование, не отличались по возрасту и паритету. Исследование лабораторных критериев бактериального вагиноза показало присутствие отдельных признаков дисбиоза у женщин основной группы в отличие от контрольной. При сравнении пациенток с рецидивирующим БВ до и после профилактического лечения, статистически значимой разницы не было получено (табл. 1).

**Таблица 1**

Присутствие отдельных лабораторных критериев Амсея у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом до и после профилактического лечения и у здоровых женщин в период гестации

Критерии	Основная группа (n=40)		p*	Контрольная группа (n=40)	p#
	До лечения	После лечения			
pH влагалища > 4,4	32 (80,0%)	30 (75,0%)	0,480	6 (17,5%)	<0,001
Ключевые клетки	11 (27,5%)	9 (22,5%)	0,617	5 (12,5%)	0,096
Положительный аминный тест	13 (32,5%)	11 (27,5%)	0,614	3 (7,5%)	0,005

\* – сравнение между пациентками основной группы до и после лечения (здесь и далее).

# – сравнение между пациентками основной группы до лечения и пациентками контрольной группы(здесь и далее).

Наличие изолированных лабораторных признаков дисбиоза влагалища свидетельствует о существовании повышенного риска возникновения очередного эпизода заболевания. Отсутствие статистически значимых различий данных характеристик у женщин до и после лечения, вероятно, свидетельствует о преопределяющей роли микроорганизмов влагалища в создании биоценоза.

Среди большого количества бактерий в женском репродуктивном тракте главная роль в создании нормальной флоры во влагалище принадлежит лактобактериям. В настоящем исследовании несмотря на значительное снижение общего количества лактобацилл у пациенток с рецидивирующим БВ, после лечения наблюдалось статистически значимое увеличение содержания лактобактерий без изменения ОБМ (табл. 2).

**Таблица 2**

Содержание лактобактерий и общая бактериальная масса во влагалище у беременных женщин исследуемых групп

Показатели, lg	Основная группа (n=40)		p*	Контрольная группа (n=40)	p#
	До лечения	После лечения			
Общая бактериальная масса	7,0±0,6	7,1±0,3	0,082	7,6±0,3	<0,001
Lactobacillus spp.	6,7±0,5	6,9±0,3	<0,001	7,6±0,2	<0,001

При этом если у 80 % женщин основной группы до лечения выявлялся умеренный дисбиоз, то после воздействия препарата интерферона данный показатель уменьшился до 67,5 % (p<0,001), за счет увеличения частоты нормоценоза.

Преобладающими видами лактобактерий являлись *L. crispatus* и *L. iners* в контрольной и основной группах соответственно. После профилактической терапии произошло увеличение абсолютных значений обоих видов лактобактерий. Но, несмотря на это, уровень *L. crispatus* у пациенток основной группы был значительно ниже, чем у здоровых беременных женщин (табл. 3).

**Таблица 3**

Содержание отдельных видов лактобактерий во влагалище у беременных женщин исследуемых групп

Показатели, lg	Основная группа (n=40)		p*	Контрольная группа (n=40)	p#
	До лечения	После лечения			
<i>L. crispatus</i>	5,8±1,3	6,5±0,8	0,001	7,5±0,2	<0,001
<i>L. iners</i>	6,2±0,9	6,6±0,7	<0,001	4,3±0,9	<0,001

При этом у пациенток основной группы с нормоценозом после лечения содержание *L. crispatus* было значительно выше (lg=7,1±0,4), а *L. iners* ниже (lg=5,6±1,4), в сравнении с остальными женщинами, биоценоз которых рассматривался как умеренный дисбиоз. К тому же, прослежена ассоциация между высоким содержанием *L. iners* и значением pH влагалищного содержимого более 4,4, что объясняет изменение кислотности влагалища у большей части женщин в период ремиссии.

У беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом имеются особенности микрофлоры влагалища, характеризующиеся увеличением относительного содержания видов *Megasphaera*, *Veilonella*, *Dialister*, *Sneathia*, *Leptotrihia*, *Fusobacterium*. Изучение влияния препарата интерферона на анаэробные микроорганизмы не показало статистически значимого уменьшения их количества (табл. 4).

**Таблица 4**

Относительное содержание анаэробных микроорганизмов во влагалище у беременных женщин исследуемых групп

Виды бактерий, lg[N/ОБМ]*	Основная группа (n=40)		p*	Контрольная группа (n=40)	p#
	До лечения	После лечения			
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas</i> spp.	-2,6±0,7	-2,7±0,4	0,095	-3,0±0,5	0,067
<i>Atopobium vaginae</i>	-2,6±0,8	-2,7±0,6	0,066	-2,9±0,4	0,078
<i>Mobiluncus</i> spp./ <i>Corynebacterium</i> spp.	-2,7±0,7	-2,8±0,4	0,646	-3,1±0,7	0,118
<i>Megasphaera</i> spp./ <i>Veilonella</i> spp./ <i>Dialister</i> spp.	-0,7±0,3	-0,9±0,6	0,055	-3,6±0,7	<0,001

Sneathia spp./ Leptotrihia spp./ Fusobacterium spp.	-0,9±0,2	-0,9±0,3	0,813	-3,6±0,7	<0,001
Eubacterium spp.	-2,8±0,7	-2,9±0,5	0,823	-3,1±0,4	0,086
Peptostreptococcus spp.	-2,7±0,7	-2,8±0,4	0,502	-3,0±0,3	0,215
Lachnobacterium spp./ Clostridium spp.	-2,7±1,0	-2,7±0,7	0,838	-3,0±0,4	0,144

\*Примечание: lg[N/ОБМ] – логарифм отношения количества микроорганизма к общей бактериальной массе.

При сравнении основной и контрольной групп по уровню ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФ-γ, НВД-2 до начала терапии выявлено статистически значимое уменьшение количества изученных цитокинов и антимикробного пептида у беременных женщин с рецидивирующим БВ. На фоне проводимого в последующем профилактического лечения препаратом интерферона альфа-2β наблюдалось увеличение концентрации во влагалище как про- так и противовоспалительных цитокинов, наряду с ростом содержания НВД-2 (табл. 5).

**Таблица 5**

Содержание ИЛ-6, ИЛ-10 и ИНФ-γ, НВД-2 во влагалище у беременных женщин исследуемых групп, Ме [25 %-75 %]

Показатели	Основная группа (n=40)		p*	Контрольная группа (n=40)	p#
	До лечения	После лечения			
ИЛ-6, пг/мл	0 [0-13,5]	0,9 [0-19,8]	<0,001	19,6 [0-32,4]	0,001
ИНФ-γ, пг/мл	3,5 [0-15,5]	4,0 [0-17,4]	0,009	9,3 [0-31,1]	0,012
ИЛ-10, пг/мл	14,0 [0-43,6]	21,7 [0-53,4]	<0,001	35,9 [0-63,2]	0,040
НВД-2, пг/мл	284 [0-762,0]	738,5 [73,0-948,0]	<0,001	1409,5 [312-1709,5]	<0,001

Примечание: Ме – медиана, 25 % – нижний квартиль, 75 % – верхний квартиль.

При оценке степени изменения концентраций изучаемых факторов неспецифического иммунитета у пациенток с рецидивирующим БВ на фоне интерферонотерапии отмечено почти трехкратное увеличение уровня НВД-2. Концентрация противовоспалительного ИЛ-10 возрасла в 1,5 раза, в то время как уровни провоспалительных цитокинов ИНФ-γ и ИЛ-6 росли в меньшей степени (табл. 5). Выявленные изменения позволяют предположить о наличии иммуностимулирующего действия препарата интерферона на неспецифический иммунитет влагалища, при котором происходит активация преимущественно противовоспалительного звена. При этом описанные изменения микрофлоры влагалища, вероятно, являются результатом взаимодействия бактериального, цитокинового и антимикробного звеньев неспецифического иммунитета влагалища, индуцированное интерфероном альфа-2b.

## Заключение

Таким образом, для пациенток с рецидивирующим бактериальным вагинозом в период ремиссии характерно наличие потенциального риска обострения заболевания, что проявляется состоянием умеренного дисбиоза, преобладанием *Lactobacillus iners* и отдельных видов анаэробов. Назначение препарата интерферона альфа-2 $\beta$  приводит к увеличению содержания ИЛ-6, ИЛ-10 и ИНФ- $\gamma$ , НВД-2, что, возможно, ведет к изменению в составе бактериальной флоры в сторону увеличения содержания лактобациллы, имеет значение в профилактике рецидивов бактериального вагиноза.

## Список литературы

1. Бадаева А.А. Нарушения микробиоты влагалища при беременности, родах и операции кесарева сечения: автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.01.01) / Бадаева Алла Анатольевна; Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко. – Воронеж, 2015. – 24 с.
2. Кремлева Е.А. Провоспалительные цитокины как регуляторы состояния микробиоценоза влагалища /Е.А. Кремлева, А.В. Сгибнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 7. – С. 88-91.
3. Bacterial vaginosis and adverse outcomes among full-term infants: a cohort study / A.S. Dingens, T.S. Fairfortune, S. Reed, C. Mitchell // BMC Pregnancy Childbirth. – 2016. – Vol. 16(1). – P. 278.
4. Correlation of bacterial vaginosis with preterm labour: a case control study / W. Nigeen, A.S. Bhat, K. Gulzar, S. Taing // Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol. – 2015. – Vol. 4. – P. 1868-74.
5. Early pregnancy changes in bacterial vaginosis-associated bacteria and preterm delivery / D.B. Nelson, A. Hanlon, I. Nachamkin, C. Haggerty, D.S. Mastrogiannis, C. Liu, D.N. Fredricks // Paediatric and Perinatal Epidemiology. – 2014. – № 28. – P. 88–96.
6. IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression / A. Olmos-Ortiz, N. Noyola-Martínez, D. Barrera, V. Zaga-Clavellina, E. Avila, A. Halhali, B. Biruete, F. Larrea, L. Díaz // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2015. – Vol. 148. – P. 18.
7. *Lactobacillus crispatus* mediates antiinflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro / A. Rizzo, M. Fiorentino, E. Buommino, G. Donnarumma, A. Losacco, N. Bevilacqua // Int J Med Microbiol. – 2015. – Vol. 305(8). – P.815-27.
8. *Lactobacillus crispatus* strain SJ-3C-US induces human dendritic cells (DCs) maturation and

- confers an anti-inflammatory phenotype to DCs / S. Eslami, J. Hadjati, E. Motevaseli, R. Mirzaei, S. Farashi Bonab, B. Ansaripour, M.R. Khoramizadeh // *APMIS*. – 2016. – 124(8). – P. 697-710.
9. Machado A. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation, Jefferson K.K., Cerca N. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun. 5;14(6):12004-12.
10. Mendling W. Vaginal Microbiota // *Adv Exp Med Biol*. – 2016. – Vol. 902. – P. 83-93.
11. Miller M. Recurrent vulvovaginitis: Tips for treating a common condition // *Contemporary OB/GYN*. – 2014. – URL: <http://contemporaryobgyn.modernmedicine.com/contemporary-obgyn/news/recurrent-vulvovaginitis-tips-treating-common-condition?page=full>.
12. Yarbrough V.L. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications / V.L. Yarbrough, S. Winkle, M.M. Herbst-Kralovetz // *Hum Reprod Update*. – 2015. – Vol. 21(3). – P. 353-77.