

# Характеристика уровня цитокинов и состояния микробиоценоза репродуктивного тракта у женщин с бесплодием

К.м.н. Е.А. КРЕМЛЁВА<sup>1,2</sup>, к.м.н. С.В. ЧЕРКАСОВ<sup>1</sup>, д.м.н., проф. О.Д. КОНСТАНТИНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (дир. — член-корр. РАН О.В. Бухарин), Оренбург; <sup>2</sup>кафедра акушерства и гинекологии Оренбургской государственной медицинской академии (зав. — проф. О.Д. Константинова)

## The level of cytokines and the state of microbiocenosis in the reproductive tract in infertile women

E.A. KREMLEVA, S.V. CHERKASOV, O.D. KONSTANTINOVA

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg; Department of Obstetrics and Gynecology, Orenburg State Medical Academy

**Целью исследования явилось выявление связи состояния микробиоценоза и цитокинового статуса нижних отделов репродуктивного тракта у 78 женщин, страдающих бесплодием. Проведено сопоставление уровней IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в вагинальном содержимом с состоянием микрофлоры влагалища и цервикального канала, а также наличием инфекций, передаваемых половым путем. Выявлено, что дисбиотические изменения в биотопах репродуктивного тракта приводят к сравнимому с инфекциями, передаваемыми половым путем, повышению уровня провоспалительных цитокинов. С учетом роли цитокинов в регуляции фертильности нарушение микробиоценоза нижних отделов репродуктивного тракта женщин, вызывающее избыточную экспрессию цитокинов, может явиться ранее неизвестной причиной бесплодия.**

*Ключевые слова:* вагинальный микробиоценоз, бесплодие, провоспалительные цитокины, инфекции, передаваемые половым путем.

**The study was undertaken to reveal a relationship between the state of microbiocenosis and cytokine status of the lower reproductive tract of 78 infertile women. The vaginal levels of IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  were compared with the vaginal and cervical canal microflora and the presence of sexually transmitted infections. Dysbiotic changes in the biotopes of the reproductive tract were found to give rise to the elevated proinflammatory cytokine levels comparable with those in sexually transmitted infections. By keeping in mind the role of cytokines in fertility regulation, impaired lower reproductive tract microbiocenosis that induces cytokine overexpression may be an earlier unknown cause of infertility.**

*Key words:* vaginal microbiocenosis, infertility, proinflammatory cytokines, sexually transmitted infections.

Несмотря на последние достижения современной медицины, проблема бесплодия остается актуальной. Одним из наиболее сложных вопросов репродуктологии является обеспечение адекватного процесса имплантации [3]. Регуляция его осуществляется путем взаимодействия эндокринной и иммунной систем и опосредуется цитокинами [6]. Сопоставление концентрации цитокинов вагинального содержимого, полученного в первую фазу менструального цикла, предшествующего стимуляции супер-овуляции, в группах, различающихся по фертильности в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), позволило выявить связь неблагоприятных исходов ЭКО с повышенным уровнем IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в вагинальном содержимом [2]. Известно, что экспрессия цитокинов может изменяться в результате взаимодействия клетки-продуцента с микроорганизмами, их фрагментами или секретируемыми продуктами бактериальной природы [12]. Накоплены данные об изменении уровня провоспалительных цитокинов в секретах репродуктивного тракта при инфекциях, передаваемых половым путем (ИППП) [9], которые зачастую протекают латентно и сопровождаются микробиологическими изменениями в

биотопах репродуктивного тракта. К сожалению, элиминация генитальной инфекции не всегда приводит к восстановлению фертильности, что, возможно, связано с остаточными микробиологическими изменениями в репродуктивной системе. При этом вопрос о влиянии на цитокиновый статус дисбиотических состояний нижних отделов репродуктивного тракта, вызванных дисбалансом соотношения доминантных и ассоциативных видов микросимбионтов, остается открытым. Учитывая это, мы предприняли попытку выявить факторы микробиоценоза, влияющие на цитокиновый профиль нижних отделов репродуктивного тракта у женщин с бесплодием.

## Материал и методы

Для достижения указанной цели мы провели исследование микробиологического состояния нижних отделов репродуктивного тракта у 78 женщин европеоидной расы при первичном обращении в ГУЗ «Областной центр планирования семьи и репродукции» (Оренбург) по поводу бесплодия. В исследовании приняли участие женщины в возрасте от 26 до 38 лет (средний возраст 32 $\pm$ 2,1 года) про-

должительность бесплодия — от 3 до 13 лет. В 68% случаев имелось первичное бесплодие, в 32% — вторичное, обусловленное преимущественно трубно-перитонеальным фактором. Случаи ИППП в анамнезе имелись у всех обследованных.

Критериями исключения из исследования служили выявление мужского фактора бесплодия, наличие экстрагенитальных заболеваний в стадии суб- или декомпенсации, а также выраженных нарушений гормонального или иммунного статуса. Все клинико-лабораторные исследования выполняли после получения информированного согласия обследуемых женщин. Сбор анамнестических данных проводили путем анкетирования и выкопировки данных из карты амбулаторного больного.

Вагинальное содержимое получали на 8—10-й день цикла с помощью стерильного катетера, омывая стенки влагалища 2 мл стерильного физиологического раствора. Для ингибирования активности протеаз к полученной пробе добавляли фенилметилсульфонилфлюорид до конечной концентрации 5 мкМ/мл. Определение концентрации цитокинов IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  проводили иммуноферментным методом, используя специальные наборы по протоколам, указанным в инструкции.

Одновременно с этим проводили микробиологическое исследование вагинального содержимого, включающее микроскопию мазка, окрашенного по Граму, и культуральное исследование влагалищного содержимого и цервикального секрета при посеве на плотные питательные среды с использованием общепринятых методов выделения и идентификации условно-патогенных микроорганизмов по комплексу морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств [4]. О воспалительной реакции судили по количеству лейкоцитов в вагинальном содержимом. Бактериальный вагиноз диагностировали согласно критериям R. Amsel (1983). Для диагностики уреaplазмоза и хламидиоза использовали метод полимеразной цепной реакции и прямой иммунофлюоресценции, диагностику трихомониаза проводили культуральным методом [1].

Статистическую обработку данных проводили методами непараметрической статистики согласно рекомендациям (Г.Ф. Лакин, 1990).

## Результаты

По результатам проведенного бактериологического исследования все пациентки были разделены на подгруппы в соответствии с выявленными ИППП, а также состоянием микрофлоры влагалища и цервикального канала. Подгруппы были сопоставимы по среднему возрасту, длительности и формам бесплодия, гормональному статусу, акушерско-гинекологическому анамнезу.

В подгруппе лиц, микробиологическое состояние нижних отделов репродуктивного тракта которых характеризовалось нормоценозом и отсутствием ИППП, концентрация IL-6 в жидкости, полученной из влагалища, составляла  $21,3 \pm 5,1$  пг/мл, TNF $\alpha$  —  $2,7 \pm 0,9$  пг/мл, IL-8 —  $366,0 \pm 69,1$  пг/мл, IL-1 $\beta$  —  $32,9 \pm 10,1$  пг/мл, что сопоставимо с данными других авторов и свидетельствует об отсутствии выраженных региональных особенностей (табл. 1).

Наиболее чувствительными к изменению состояния микробиоценоза оказались IL-1 $\beta$  и IL-8, уровень которых повышался как в присутствии возбудителей ИППП, так и

в ответ на дисбаланс соотношения видов доминантных и ассоциативных влагалищных микросимбионтов.

Дисбаланс микрофлоры характеризовался повышением уровней IL-8 и IL-6, сопоставимым с повышением уровней этих цитокинов, вызванным ИППП, а концентрация IL-1 $\beta$  в вагинальной жидкости превышала этот уровень. Сочетание ИППП с дефицитом лактофлоры приводило к достоверному повышению уровня IL-1 $\beta$  с  $55,0 \pm 11,3$  пг/мл при изолированном хламидиозе до  $325,4 \pm 131,6$  пг/мл при сочетании хламидиоза с дефицитом лактобактерий и с  $37,8 \pm 1,5$  пг/мл при уреaplазмозе до  $87,6 \pm 21,1$  пг/мл при уреaplазмозе, протекающем на фоне дефицита лактобактерий (табл. 2). Это свидетельствует о том, что дефицит лактобактерий, выступающих в роли доминантного вагинального микросимбионта, является фактором, влияющим на повышение уровня провоспалительных цитокинов в нижних отделах репродуктивного тракта женщин.

Выявление нескольких факторов, дестабилизирующих нормоценоз влагалища и цервикального канала (нескольких ИППП, дефицита лактобактерий, бактериального вагиноза), коррелировало с кратностью повышения концентрации провоспалительных цитокинов в вагинальном содержимом (табл. 3).

## Обсуждение

Традиционно считается, что инфекции половых путей являются одним из основных этиологических факторов бесплодия, опосредованного нарушением транспортной функции труб и измененным состоянием эндометрия. При этом имеются наблюдения, свидетельствующие о том, что распространенность ИППП в группах фертильных и инфертильных пациенток не имеет достоверных различий [5]. В то же время известно, что в большинстве случаев инфекции половых путей имеют стертое, латентное течение, сопровождаясь значительными нарушениями микробиоценоза нижних отделов репродуктивного тракта. Возможно, именно состояние микробиоценоза репродуктивного тракта является определяющим для сохранения фертильности у пациенток данной группы. В подтверждение этого можно привести данные о связи инфертильности с наличием бактериального вагиноза [10], а также высокую частоту нарушений микробиоценоза влагалища у женщин с идиопатическим бесплодием [7].

Зафиксированное при дефиците лактобактерий повышение уровня IL-1 $\beta$ , возможно, связано с отсутствием ингибирующего влияния лактобактерий на TLR-4, опосредующих активацию NF- $\kappa$ B, что было продемонстрировано на примере энтероцитов [11]. Изменение в микробиологии нижних отделов репродуктивного тракта сопровождается изменением цитокинового статуса эндометрия. Так, было выявлено увеличение концентрации IL-1 $\beta$  в эндометриальном секрете у женщин, страдающих бактериальным вагинозом [8]. Повышение уровня провоспалительных цитокинов приводит к нарушению развития беременности [6], и, как следствие, к неудачным попыткам применения вспомогательных репродуктивных технологий, невынашиванию беременности. Таким образом, нарушение микробиоценоза нижних отделов репродуктивного тракта женщин, вызывающее избыточную экспрессию цитокинов, может явиться причиной инфертильности, ранее неизвестной, что открывает новые диагностические и терапевтические перспективы и обосновывает

**Таблица 1. Концентрация цитокинов в вагинальном содержимом в зависимости от состояния микробиоценоза влагалища и цервикального канала (пг/мл)**

Состояние микробиоценоза	IL-6	TNF $\alpha$	IL-8	IL-1 $\beta$
Нормоценоз (n=12)	21,3 $\pm$ 5,1	2,7 $\pm$ 0,9	366,0 $\pm$ 69,1	32,9 $\pm$ 10,1
Дефицит лактобактерий (n=9)	52,9 $\pm$ 11,0*	1,7 $\pm$ 0,6	792,6 $\pm$ 114,6*	434,8 $\pm$ 217,2*
Бактериальный вагиноз (n=6)	39,8 $\pm$ 21,4	2,1 $\pm$ 0,8	780,3 $\pm$ 101,8*	480,6 $\pm$ 274,7*
Трихомониаз (n=6)	56,5 $\pm$ 15,6*	6,7 $\pm$ 3,2	1244,6 $\pm$ 12,7*	237,9 $\pm$ 102,6*
Хламидиоз (n=8)	69,4 $\pm$ 12,9*	6,9 $\pm$ 1,7*	1090,6 $\pm$ 113,8*	55,0 $\pm$ 11,3
Хламидиоз в сочетании с дефицитом лактобактерий (n=10)	126,9 $\pm$ 37,7*	8,1 $\pm$ 1,8*	986,9 $\pm$ 97,5*	325,4 $\pm$ 131,6*
Уреаплазмоз (n=6)	16,8 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,1	949,7 $\pm$ 9,1*	37,8 $\pm$ 1,5
Уреаплазмоз в сочетании с дефицитом лактобактерий (n=8)	15,6 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 1,7	981,1 $\pm$ 189,3*	87,6 $\pm$ 21,1*
Трихомониаз в сочетании с хламидиозом и дефицитом лактобактерий (n=6)	83,4 $\pm$ 12,7*	13,6 $\pm$ 2,6*	1204,5 $\pm$ 72,7*	392,3 $\pm$ 115,1*
Уреаплазмоз в сочетании с хламидиозом и дефицитом лактобактерий (n=7)	178,4 $\pm$ 91,1*	12,0 $\pm$ 3,6*	1027,6 $\pm$ 219,0*	625,4 $\pm$ 284,7*

*Примечание.* \* — различие показателей в подгруппах с нарушением микробиоценоза и в подгруппе с нормоценозом достоверно ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2. Концентрация цитокинов в вагинальном содержимом в зависимости от обсемененности лактобактериями**

Цитокин, пг/мл	ПМО лактобактерий $\geq 5$ lg КОЕ/мл		ПМО лактобактерий $< 5$ lg КОЕ/мл	
	хламидиоз	уреаплазмоз	хламидиоз	уреаплазмоз
IL-6	69,4 $\pm$ 12,9	16,8 $\pm$ 0,8	126,9 $\pm$ 37,7	15,6 $\pm$ 1,2
TNF $\alpha$	6,9 $\pm$ 1,7	0,4 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 1,8	2,5 $\pm$ 1,7
IL-8	1090,6 $\pm$ 113,8	949,7 $\pm$ 9,1	986,9 $\pm$ 97,5	981,1 $\pm$ 189,3
IL-1 $\beta$	55,0 $\pm$ 11,3	37,8 $\pm$ 1,5	325,4 $\pm$ 131,6*	87,6 $\pm$ 21,1*

*Примечание.* \* — различие показателей микробной обсемененности (ПМО) в подгруппах с нормальным титром и дефицитом лактобактерий достоверно ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 3. Средняя кратность превышения концентрации цитокинов в вагинальном содержимом (по сравнению с показателями в подгруппе с нормоценозом) при наличии одного, двух и более факторов, дестабилизирующих нормоценоз**

Число факторов	IL-6	TNF $\alpha$	IL-8	IL-1 $\beta$
Один	2,2	2,5	2,7	7,6
Два	3,3	3,0	2,7	6,3
Три и более	6,1	4,7	3,0	15,5

необходимость поиска эффективных способов коррекции нарушений микробиологического состояния репродуктивного тракта женщин с бесплодием.

## Выводы

1. Факторами, способствующими повышению уровня провоспалительных цитокинов в вагинальном содержимом, являются, наравне с ИППП, дисбиотические состояния нижних отделов репродуктивного тракта.

2. Сочетание ИППП с дисбиотическими состояниями нижних отделов женского репродуктивного тракта приводит к дополнительному повышению уровня провоспалительных цитокинов во влагалищном содержимом.

3. Дефицит доминантного вагинального микросимбионта — лактобактерий — сопровождается многократным повышением концентрации IL-1 $\beta$  в вагинальном содержимом.

4. Ввиду того, что состояние микробиоценоза репродуктивного тракта женщины влияет на профиль цитокинов, принимающих участие в регуляции фертильности, дисбиотические состояния могут быть этиологическими факторами бесплодия. С этих позиций перспективным может быть включение в комплексную терапию бесплодия мероприятий, направленных на коррекцию микробиологического состояния репродуктивного тракта под контролем уровня цитокинов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Дмитриев Г.А.* Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М: Медицинская книга 2007; 332.
2. *Кремлева Е.А., Константинова О.Д., Черкасов С.В.* Микробиологическое состояние вагинального биотопа пациенток, оппозитных по фертильности в программе ЭКО. Мед альманах 2010; 4: 95—97.
3. *Кулаков В.И.* Лечение женского и мужского бесплодия. М: МИА 2005; 592.
4. *Определитель бактерий Берджи.* Под ред. Дж. Хулга, Н. Крига, П. Снита и др. Пер. с англ. М: Мир 2001; 800.
5. *Шевченко Е.А.* Этиопатогенетическая роль урогенитальной инфекции в развитии бесплодия: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Н. Новгород 2009; 44.
6. *Ширшев С.В.* Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции. Екатеринбург: УрО РАН 2002; 1: 140.
7. *Aboul Enien W.M., Metwally H.A.* Association of abnormal vaginal flora with increased cervical tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma levels in idiopathic infertility. Egypt J Immunol 2005; 12: 2: 53—59.
8. *Boomsma C.M., Kavelaars A., Bozkurt N., Eijkemans M.J., Fauser B.C., Heijnen C.J., Macklon N.S.* Is bacterial vaginosis associated with a pro-inflammatory cytokine profile in endometrial secretions of women undergoing IVF? Reprod Biomed Online 2010; 21:1:133—141.
9. *Guha D., Chatterjee R.* Cytokine levels in HIV infected and uninfected Indian women: correlation with other STAs. Exp Mol Pathol 2009; 86: 1: 65—68.
10. *Mania-Pramanik J., Kerkar S.C., Salvi V.S.* Bacterial vaginosis: a cause of infertility? Int J STD AIDS 2009; 20: 11: 778—781.
11. *Petrof E.O., Claud E.C., Sun J., Abramova T., Guo Y., Waypa T.S., Nakagawa Y., Chang E.B.* Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF-KappaB pathways and inhibits proteasome function. Inflamm Bowel Dis 2009; 15: 10: 1537—1540.
12. *Pivarcsi A., Nagy I., Koreck A., Kis K., Kenderessy-Szabo A., Dobozsy A., Kemeny L.* Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. Microbes Infect 2005; 7: 9—10: 1117—1127.