

## Связь уровней экспрессии генов TLR-2 и TLR-4 с изменениями микробиоценоза урогенитального тракта при урогенитальном хламидиозе у женщин

Е.А. Воропаева, А.В. Караулов, А.Л. Байракова, С.С. Афанасьев, В.А. Алёшкин, Л.И. Кафарская, Ю.В. Несвижский, Б.А. Ефимов, А.Н. Шкопоров, О.Г. Гречишникова, С.А. Леваков, В.А. Метельская, М.С. Афанасьев, Е.А. Егорова, В.В. Слободенюк, Е.В. Фандеева

ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора; ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава, Москва; Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

## The connections between the levels of the TLR-2 and TLR-4 expression and the changes in the microbiocenosis of the urogenital tract in women with the urogenital chlamidiosis

E.A. Voropaeva, A.V. Karaulov, A.L. Bairakova, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin, L.I. Kafarskaia, U.V. Nesvizhskii, B.A. Efimov, A.N. Shkoporov, O.G. Grechishnicova, S.A. Levakov, V.A. Metelskaia, M.S. Afanasiev, E.A. Egorova, V.V. Slobodenuk, E.V. Fandeeva

Russian Medical University, Moscow

### Аннотация

Проведено клинико-лабораторное обследование 41 пациентки с острой урогенитальной хламидийной инфекцией, 29 пациенток с хронической урогенитальной хламидийной инфекцией, 30 пациенток, в анамнезе которых ранее диагностировался урогенитальный хламидиоз (маркеры этих микроорганизмов в урогенитальном тракте не были выявлены ни одним из использованных методов в течение 1 года), 32 здоровых донора женского пола (группа сравнения). У больных урогенитальным хламидиозом установлено повышение экспрессии генов TLR-2 и TLR-4, как в Цк, так и в Ур, которое коррелировало с тяжестью клинических проявлений, зависящей как от хламидий, так и от ассоциатов (возбудителей ИППП и УПМ). При хламидийной инфекции не осложненной и осложненной наличием ассоциатов воспалительный процесс в УГТ характеризуется разными типами ответов в отношении экспрессии генов рецепторов. При остром урогенитальном хламидиозе наблюдается более высокий всплеск экспрессии TLR-2 и TLR-4 в Цк и Ур. При хроническом или асимптомном течении экспрессия генов TLR-2 и TLR-4 находится на уровне, намного ниже нормы. Повышение уровня экспрессии генов TLR коррелирует не только с патогенностью ассоциатов, но и тяжестью клинических проявлений воспалительного процесса, что позволяет использовать данный показатель для определения степени

### Summary

The clinical and laboratory examination of 41 patients with the acute urogenital chlamidiosis, 29 patients with the chronic urogenital chlamidiosis and 30 patients with the urogenital chlamidiosis in the anamnesis (the markers of this infection had not been determined in the urogenital tract by all the methods used for 1 year) and 32 healthy women (the control group) was carried out. The increasing of the TLR-2 and TLR-4 gene expression levels was determined in the patients with the urogenital chlamidiosis (in urethra and in the cervical canal). The correlation between the level of the clinical manifestation severity, connected not only with Chlamydia, but also with the other etiological agents (associates) of sexually transmitted diseases, and the expression levels of those genes was revealed. The inflammation process which takes place in the patients with chlamidiosis (complicated and uncomplicated with the associates) is characterized by the different responses in the gene expression levels. In the presence of the acute urogenital chlamidiosis the higher level of the TLR-2 and TLR-4 gene expression is observed, than in the presence of chronic or asymptomatic disease course, when the expression levels of those genes are very low. The increase in the TLR genes expression levels correlates not only with the pathogenicity degree of the associates but also with the clinical manifestation severity, this fact allows us to use this marker in order to evaluate the activity degree of the cell –

активности клеточного звена иммунитета и воспалительного ответа. Различные уровни активации TLR-2 и TLR-4 зависят от количественного и качественного состава микробных сообществ, присутствующих на слизистой оболочке УГТ. Наличие разнообразных бактериальных патогенов приводит к гораздо более высокой активации TLR-2, по сравнению с TLR-4.

### Ключевые слова

Урогенитальный хламидиоз, экспрессия генов TLR, инфекции, передаваемые половым путём (ИППП), условно-патогенные микроорганизмы (УПМ).

Решение проблемы персистирующей и хронической урогенитальной хламидийной инфекции связано с перспективой исследования морфологии и иммунопатологии взаимодействия хламидий и организма-хозяина [1, 2, 3, 4]. В регуляции воспалительной реакции на заражение *Chlamydia trachomatis* и её конечных патологических последствиях наибольшее внимание уделяется врожденной антиинфекционной системе. Открытие участия Toll-подобных рецепторов (TLR) [6, 7, 8] во врожденном иммунном ответе макроорганизма побудило к исследованию этих рецепторов как потенциальных регуляторов ответа организма на хламидии. В настоящее время хорошо охарактеризовано тринадцать членов семейства Toll-подобных рецепторов, которые являются связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунной системой. TLR-4 взаимодействует с липополисахаридом (ЛПС) грамотрицательных бактерий, F-протеином (белком слияния) респираторно-синцитиального вируса и оболочечным белком МТТ вируса (mouse mammary tumor virus) [9]. TLR-2 вовлечен в распознавание широкого ряда микробных продуктов, включая пептиогликан грамположительных бактерий [9, 10], бактериальные липопротеины [11], липоарабиноманнан микобактериальной клеточной стенки [12] и клеточной стенки дрожжей [13]. Как отдельные члены, так и комбинация этих рецепторов могут создавать не только быструю защиту от патогенов путем активации врожденной иммунной системы, но и распознавать практически все основные типы патогенов: бактерий, вирусов, грибов, простейших и гельминтов.

Целью работы было изучение взаимосвязи между экспрессией генов TLR-2 и TLR-4 в эпителиальных клетках урогенитального тракта (УГТ), хламидиями и условно-патогенными микроорганизмами.

bound immunity and the inflammation response. Different levels of the TLR genes activation depend on the quality and quantity characteristics of the microbiotic biome, presented on the mucosal surfaces of the urogenital tract. The presence of the various bacterial pathogens leads to much higher activation of the TLR-2 if compared with the TLR-4.

### Key words

Urogenital chlamidiosis, cultural diagnostics, TLR genes expression, sexually transmitted diseases, opportunistic microbes, chronicity, asymptomatic [quiescent, occult, hidden] disease course

### Материалы и методы

Клинические, анамнестические, микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические данные обследования 132 пациентов, женщин в возрасте 20-38 лет, позволили их разделить на IV группы. Группу I составила 41 пациентка, в материале из различных отделов УГТ которых обнаруживались маркеры хламидий, при этом в крови присутствовали антитела (Ат) класса IgA и IgG в титре от 1:50 и выше. Клинические проявления, положительные результаты реакции прямой иммунофлюоресценции (РИФ), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и культурального посева на хламидии, позволили выявить активную стадию острой урогенитальной хламидийной инфекции. Пациенты отрицали наличие ранее перенесенного хламидиоза.

Группу II составляли 29 пациенток с диагнозом хронической урогенитальной хламидийной инфекции, в сыворотки крови которых определялись стойкие титры Ат к *Ch.trachomatis* (IgA и IgG 1:100-200). Критериями для включения в исследование были схожесть клинических проявлений и наличие, по крайней мере, двух эпизодов обострения заболевания в течение предшествующих 12 мес. На момент обследования у всех изучаемых больных был клинически и лабораторно подтвержденный рецидив заболевания, длительность которого составляла от 3 до 5 лет. Рецидивы отмечались с частотой 1 раз в полгода. Все больные неоднократно получали антибактериальную терапию, однако не наблюдалось стойкого клинического и бактериологического положительного эффекта.

В группу III вошли 30 пациенток, в анамнезе которых ранее диагностировался урогенитальный хламидиоз, определялись сывороточные специфические IgG-Ат в титре 1:50-1:200,

указывающие на давно перенесенную инфекцию. Маркёры хламидий в УГТ не выявлялись ни одним из использованных методов диагностики в течение 1 года.

В группу сравнения (IV, контрольная) включили 32 клинически здоровых женщин доноров. Клинико-лабораторное обследование не подтверждало наличие у них каких-либо признаков инфекций и гинекологической патологии.

У всех пациентов было получено информированное согласие на процедуру забора биологического материала и разъяснены цели исследования.

#### *Клинико-лабораторные методы*

Диагноз урогенитальной инфекции хламидийной этиологии устанавливался на основании результатов стандартных клинико-инструментальных методов обследования [4]: исследовании соскобного материала методом ПЦР, выделения хламидий на культуре клеток McCoу. Дополнительным критерием служил анализ уровней титров IgG-Ат, IgA-Ат в сыворотке крови иммуноферментным методом (ИФА). Лабораторный контроль излеченности урогенитального хламидиоза проводили после окончания курса лечения.

Инфицированность возбудителями инфекций, передаваемых половым путём (ИППП): папилломатозом (ВПЧ), герпесом (ВПГ), цитомегаловирусами (ЦМВ), микоплазмами, уреоплазмами, токсоплазмами, кандидами - устанавливалась общепринятыми методами ПЦР и ИФА, а микоплазмами, уреоплазмами, кандидами - дополнительно культуральным методом (обнаружение возбудителя в исследуемом материале более чем в  $10^4$  КОЕ/мл свидетельствовало о наличии выраженного инфекционного процесса, а  $10^3$  КОЕ/мл и менее - о носительстве).

#### *Молекулярно-генетические методы определения экспрессии генов TLR-2 и TLR-4*

В день обследования у женщины получали мазки-соскобы со слизистой УГТ: влагалища (Вл), цервикального канала (Цк) и уретры (Ур) с помощью стерильных урогенитальных зондов, позволяющих получить со слизистой слой поверхностных эпителиальных клеток. Для определения достоверных количественных различий в уровнях экспрессии мРНК TLR-2 и TLR-4 в различных областях УГТ, забирали соскоб от одного и того же больного дважды и сравнива-

ли в парах с выполнением статистического анализа. Согласно экспериментальным данным количество исследуемого материала при заборе урогенитальным зондом составляло - 0,2 г. Содержимое зондов тщательно суспендировали в забуференном физиологическом растворе в пробирках типа «Эппендорф» с последующим определением количества эпителиальных клеток с помощью слайд-планшета (Плива-Лаксма, Чехия). Конечная концентрация клеток в образце составляла не более  $1 \times 10^5$  клеток в мл. Полученный материал суспендировали в растворе EverFresh RNA (ЗАО «Силекс» г. Санкт-Петербург) в соотношении 1:5 относительно объема клеточной суспензии. Уровень экспрессии генов TLR определялись ПЦР в реальном времени (РВ), совмещенной с обратной транскрипцией с использованием специфических праймеров к TLR-2 (TLR2-F1 - CCTTCACTCAGGAGCAGCAAGC; TLR2 - R1 TGGAAACGGTGGCACAGGAC) и TLR-4 (TLR4-F6 - GAAGGGGTGCCTCCATTTTCAGC; TLR4-R6 - TGCCTGAGCAGGGTCTTCTCCA). Уровни экспрессии мРНК TLR контролировали (стандартизировали) по гену GAPDH (GAPDH-F1 - TGCMTCTCCTGCACCACCAACT; GAPDH-F2 - YGCCTGCTTCACCACCTTC) за счет сходной экспрессии этого гена среди тканей человеческого репродуктивного тракта. Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК согласно протоколу к наборам для выделения тотальной РНК на магнитных частицах  $\text{SiO}_2$  - бесфенольное выделение для микроанализа (ЗАО «Силекс», г. Санкт-Петербург). Синтез первой цепи кДНК проводили, согласно указаниям инструкции набора для синтеза первой цепи кДНК (базовый) (ЗАО «Силекс» г. Санкт-Петербург). Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии TLR проводили методом ПЦР с детекции накопления продуктов реакции «в режиме реального времени» (Real-Time PCR, USA) с помощью детектирующего амплификатора АМК-32 («Синтол», Россия) и специфических праймеров к TLR-2 и TLR-4. Количество исследуемых кДНК в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов ПЦР в РВ на образцах серийных разведений очищенного ПЦР-продукта в качестве матрицы. Нормализация количества изучаемых транскриптов к общему количеству кДНК в пробе определялась через отношения TLR2/GAPDH и TLR4/GAPDH. Экспрессию генов TLR оценивали в относительных единицах (ОЕ).

### Микробиологические исследования

Выполнялись согласно рекомендациям МЗ РФ [3]. На кровяном солевом агаре «Уриселект-4» («Био-Рад») определялись стафилококки, энтерококки, коринобактерии. На 5% кровяном агаре и среде Сабуро подсчитывались колонии дрожжеподобных грибов. Диагностическим считался титр  $10^3$  КОЕ/мл и выше. Для определения бифидофлоры использовали среду Блаурокка. Посев проводился из разведения  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ - $10^{-5}$ - $10^{-6}$ . Материалами для цитологического исследования служили соскобы эпителия с поверхности Вл, Ур и Цк.

### Статистическая обработка материала

Полученные результаты исследований были подвергнуты обработке методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Для каждого показателя проверялась статистическая гипотеза о нормальности распределения данных по критерию о равенстве дисперсий. В случае нормального распределения о достоверности различий средних величин судили по критерию Стьюдента (t). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программы Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

Нормальный микробиоценоз и факторы локального иммунитета на уровне шейки матки и уретры являются первой линией противoinфекционной защиты, которые предупреждают или ограничивают размножение микроорганизмов в УГТ и препятствуют их проникновению в верхние отделы. С этой точки зрения особое внимание уделяется маркерам воспаления на локальном (местном) уровне, повышение которых могло бы свидетельствовать о прорыве первой линии противoinфекционной защиты и генерализации воспалительного процесса.

При исследовании взаимосвязи уровней экспрессии TLR-2 и TLR-4 с различными патогенами в четырех сравниваемых группах проведен качественный и количественный анализ ИППП и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) различных отделов УГТ. Для подтверждения наличия и клинического варианта течения уреа- и микоплазменной инфекции, выявленной в ПЦР, у исследуемых лиц проводился культуральный посев для установления клинических значимых концентраций

*Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*. Инфекции, вызываемые ВПГ, ЦМВ и ВПЧ, относятся к инфекциям с нетипичной динамикой антителообразования (когда наличие IgM-Ат не является достоверным и достаточным признаком для дифференциации стадий заболевания). Поэтому инфицирование ВПГ, ВПЧ и ЦМВ подтверждали дважды (выявление вируса при двух последовательных визитах).

У 7 человек I группы выявлена хламидийная моноинфекция, а у 34 пациентов - в сочетании с другими патогенами (различные ассоциации патогенов с преобладанием 2- и 3-компонентных - 14,8% и 22,2%, соответственно). На момент обследования в I группе был выявлен наиболее широкий спектр сопутствующих возбудителей ИППП: уреаплазм, микоплазм, ВПЧ, ВПГ, ЦМВ, трихомонад и токсоплазм. У 14 человек вирифицирована *U. urealyticum*. Достоверных различий встречаемости биоваров *U. urealyticum* Parvo, T-960 у пациентов получено не было, однако выявлено одновременное доминирование этих двух типов, что значительно усугубляло течение хламидиоза. Микоплазмы выявлены у 10 пациенток. У 2 больных был диагностирован токсоплазмоз и трихомониаз. Наибольшее количество инфицированных ВПЧ находилось именно в I группе (17 пациентов). У 13 больных установлено наличие вируса ВПЧ низкой онкогенности (6 и 11), и у 4 человек превалировало содержание ВПЧ с ЦМВ или сразу несколько типов ВПЧ (16, 18 и 35) с высокой онкогенной способностью. Наличие единичных патогенов из УПМ, так и их ассоциаций было диагностировано во Вл в I группе у 30 пациенток, Цк - у 34, Ур - у 21 больных. Причем у большинства больных наблюдался сочетанный характер инфицирования УПМ и возбудителями ИППП. Количество УПМ, представленной  $\alpha$ -,  $\gamma$ -гемолитическими стрептококками, энтерококками, стафилококками, коринобактериями, бактериями рода *Enterobacteria* и грибов рода *Candida*, в Цк не превышало  $3,7 \pm 1,56$  lg КОЕ/г, в Ур  $4,2 \pm 0,51$  и Вл  $8,1 \pm 0,37$ , соответственно. Наиболее часто регистрировались микстинфекции (2-7-компонентные ассоциации патогенов).

Исследования во II группе на наличие возбудителей ИППП и УПМ в Цк выявили у 14 больных хламидийную моноинфекцию и у 15 больных сочетанный характер инфицирования ИППП и УПМ. У 6 больных выявлена

уреаплазма, у 3 больных - микоплазма, у 8 больных - ВПЧ. Частота инфицирования ВПГ и ЦМВ составляла 3,44% и 0,00%. УПМ во Вл выявлялась у 20 больных, в Ур - у 7 больных и Цк - у 15 больных. В различных областях УГТ обнаруживались  $\alpha$ -гемолитические стрептококки, энтерококки, стафилококки, кишечная палочка и клебсиелла и грибы рода *Candida* в количестве: Цк -  $3,80 \pm 0,27$ , Ур -  $2,3 \pm 0,51$  lg КОЕ/г и Вл -  $4,58 \pm 1,01$  lg КОЕ/г. При микст-инфекциях регистрировались 2-5-компонентные ассоциации инфекционных агентов.

В III группе у 9 женщин из УГТ выделялись УПМ (энтерококки, стрептококки, стафилококки, кишечная палочка и грибы рода *Candida*) в концентрации  $1,36 \pm 0,37$  lg КОЕ/г в Цк, Ур - у 7 обследованных в титре  $2,50 \pm 0,83$  и Вл -  $2,5 \pm 1,2$  lg КОЕ/г у 11 женщин. У 43,3% обследованных наблюдалось хроническое течение инфекционной патологии. Первичное выявление возбудителей ИППП зафиксировано в 2004-2006 гг. Из бактериальных патогенов наиболее часто встречалась уреаплазма - у 4 человек, при этом у 3 пациенток уреаплазмоз встречался как моноинфекция и сочетанное инфицирование уреа-микоплазмой у одной пациентки; ВПЧ определялись у 8 больных. Регистрировалось формирование 2-3 компонентных ассоциаций патогенов.

В IV группе ни одним из известных способов (ПЦР, ИФА, культуральный посев) не были выявлены ИППП. Количество УПМ, представленной стафилококками,  $\gamma$  ( $\alpha$ )-стрептококками не превышало  $1,94 \pm 0,73$  lg КОЕ/г в Цк,  $1,32 \pm 0,37$  и  $2,74 \pm 0,94$  lg КОЕ/г в Ур и Вл, соответственно.

Значительная вариабельность качественных и количественных показателей микроорганизмов во всех обследованных группах не позволяла провести достоверные сравнения между уровнем экспрессии генов TLR и численным количеством какого-либо отдельного патогена. Сложность и неоднозначность результатов сравнения уровней экспрессии генов TLR в эпителии Цк и Ур среди изучаемых групп можно объяснить наличием сопутствующих возбудителей ИППП, которые также способны влиять на экспрессию.

Пациентов I и II групп разбили на четыре этиологические подгруппы согласно тщательно собранному анамнезу, бактериологическому посеву и лабораторным исследованиям на наличие ИППП (табл. 1). К *первой этиологической подгруппе* отнесены пациенты, у которых отсутствовали любые ассоцианты (возбудители

ИППП, УПМ). Отсутствие возбудителей ИППП, присутствие как отдельных видов УПМ ( $\geq 10^3$  КОЕ/мл), так и наличие их ассоциаций объединило пациентов во *вторую этиологическую подгруппу*. *Третью этиологическую подгруппу* представляли пациенты, у которых обнаруживались различные возбудители ИППП, но в различных отделах УГТ не определялись УПМ. В *четвертую этиологическую подгруппу* больных включены пациенты, у которых одновременно определялось как наличие возбудителей ИППП, так и УПМ ( $\geq 10^3$  КОЕ/мл).

Сравнение межгрупповых показателей экспрессии генов TLR-2 в Цк и Ур выявили достоверные различия при сравнении показателей I группы ( $57,0 \pm 9,95$  ОЕ и  $37,3 \pm 7,02$  ОЕ) с III ( $18,67 \pm 2,39$  ОЕ и  $13,46 \pm 1,80$  ОЕ) и IV группами ( $17,02 \pm 2,1$  ОЕ и  $11,9 \pm 1,8$  ОЕ) при  $p < 0,05$ . Эти данные также подтверждают нормализацию показателей экспрессии генов TLR-2 в Цк и Ур при отсутствии инфекционных возбудителей. Наибольшая экспрессия генов TLR-2 в I группе является показателем более активного воспаления, которое ассоциировано не только с первичным инфицированием хламидиями, но и наличием сопутствующих ИППП (впервые инфицируемых). У больных II группы средние значения уровней экспрессии генов TLR-2 в Цк и Ур ( $5,71 \pm 1,07$  ОЕ и  $3,45 \pm 1,46$  ОЕ) не зависели от фазы патологического процесса и наличия сопутствующих инфекций, и были достоверно ниже соответствующих показателей пациентов IV группы ( $17,02 \pm 2,1$  ОЕ и  $11,9 \pm 1,8$  ОЕ), что указывало на снижение врожденного местного иммунитета. Уровень экспрессии генов TLR-2 в Цк и Ур больных III группы по сравнению с IV группой статистически не отличим, что свидетельствует о большей выраженности воспалительного процесса при наличии патогенной флоры.

Анализ зависимости уровня экспрессии генов TLR-2 в I группе (табл. 1) выявил наиболее высокие показатели уровней экспрессии генов TLR-2 в Цк и Ур у больных с четвертой этиологической подгруппой, что связано с совокупным воздействием УПМ, ИППП и патологического процесса (достоверно выше чем у больных первой этиологической подгруппы при  $p < 0,05$ ). При внутригрупповом индивидуальном анализе было выявлено повышение экспрессии генов TLR-2 в Цк, которое коррелировало как с клиническими проявлениями заболевания, так и позволяло судить о недавнем инфицировании. Сочетание

Таблица 1

**Нарушение микробиотопа различных отделов УГТ и уровень экспрессии генов TLR (ОЕ) у больных с различными этиологическими подгруппами инфекционного процесса**

Этиологические подгруппы инфекционного процесса	TLR-2			TLR-4		
	Цервикальный канал	Уретра	Влагалище	Цервикальный канал	Уретра	Влагалище
1. Хламидийная инфекция как монокультура n(I/II)= 7/14	36,3±4,1/ 7,2±1,9	28,0±3,9/ 3,5±0,4	36,8±9,1/ 25,3±5,1	16,3±1,8/ 2,5±0,2	16,59±4,3/ 6,3±1,3	27,2±3,5/ 36,2±16,6
2. Хламидийная инфекция в сочетании с УПМ n(I/II)= 16/18	67,9±14,2/ 13,0±3,0	19,6±4,5/ 6,2±4,3	34,11±2,5/ 31,8±2,6	45,6±11,9/ 24,2±6,1	28,4±5,2/ 12,3±4,6	35,4±6,6/ 18,4±4,5
3. Хламидийная инфекция в сочетании с ИППП n(I/II)= 22/14	51,8±8,3/ 8,6±2,71	20,81±3,6/ 5,9±2,6	28,0±3,91/ 30,3±3,8	27,2±6,12/ 7,2±1,6	16,7±3,5/ 12,41±8,4	16,7±3,5/ 17,9±3,5
4. Хламидийная инфекция в сочетании с ИППП и УПМ n(I/II)= 34/12	94,8±6,11/ 10,6±4,4	30,7±4,5/ 11,8±6,7	33,4±4,6/ 21,49±6,7	34,2±6,3/ 9,4±6,4	34,2±6,3/ 2,3±4,63	46,3±15,2/ 16,7±8,2

Примечания: в числителе средние значения показателей экспрессии генов TLR для I группы, в знаменателе - для II группы; n- число пациентов в группе.

пяти возбудителей инфекций (два биовара уреоплазм, микоплазмы и вирусы) и УПМ приводит к максимальной активации экспрессии генов TLR-2 в I группе Цк и Ур (122,4 ОЕ и 75,6 ОЕ). При этом уровень экспрессии TLR-2 той же группы, но при сочетании с уреоплазмой, микоплазмой был несколько ниже 56,8 ОЕ и 34,5 ОЕ, что, вероятно, отражает специфику инфицирования. Уровень экспрессии генов этого же рецептора у больных первой этиологической подгруппы был достоверно выше чем в IV при  $p < 0,05$ , но не превышал таковой при микст-инфекциях. Таким образом, сочетание хламидий с различными видами микроорганизмов, в частности, с уреоплазмой и микоплазмой, способно интенсифицировать экспрессию TLR-2.

Средний уровень экспрессии гена TLR-2 у пациентов II группы с первой этиологической подгруппой в Цк и Ур составлял 7,2±1,9 ОЕ и 3,5±0,4 ОЕ, соответственно, и у пациентов третьей этиологической подгруппы - 8,6±2,71 ОЕ и 5,9±2,6 ОЕ, соответственно (табл. 1). У некоторых пациентов фаза активации инфекционного процесса характеризовалась резким снижением уровней экспрессии генов TLR-2 вплоть до нулевых значений. Сходная ситуация наблюдалась у 3 из 41 пациентки I группы (уровень экспрессии не превышал 10 ОЕ), что отражало на-

чало хронизации инфекционного процесса. Выявленный факт можно объяснить и тем, что, во-первых, именно макроорганизм осуществляет контроль клеточной гибели и тем самым регулирует уровень экспрессии транскрипционных факторов. При этом хламидии являются теми патогенами, для которых доказано участие в апоптозе клеток хозяина (как про-, так и антиапоптозная активность). Индукция или подавление апоптоза на уровне макроорганизма определяют характер развития инфекции: продуктивная инфекция либо персистенция. Подавление апоптоза приводит к диссеминации возбудителя в различные ткани и органы, распространению инфекционного процесса, выживанию патогена и его персистенции. Во-вторых, может быть нарушен как механизм интеграции хламидий в клетку хозяина, так и утрата отдельных структурных компонентов (антигенов) хламидиями, способствующих распознаванию эукариотическими клетками. В-третьих, патогенностью отдельных штаммов хламидий и ухода от атаки защитных факторов макроорганизма с преобладанием той или иной тактики для обеспечения внутриклеточного размножения или элиминации из организма.

Независимо от наличия сопутствующей патологии у большинства пациентов при меж-

групповом сравнении уровней экспрессии генов TLR-4 в Цк и Ур не превышал 48 ОЕ и 18 ОЕ. В I группе составил  $34,80 \pm 1,72$  ОЕ и  $16,28 \pm 2,82$  ОЕ, во II -  $8,01 \pm 1,08$  ОЕ и  $2,00 \pm 0,83$  ОЕ, в III -  $13,50 \pm 0,93$  ОЕ и  $9,00 \pm 1,98$  ОЕ против  $13,8 \pm 1,9$  ОЕ и  $7,80 \pm 1,03$  ОЕ в IV группе, соответственно. У пациенток I и II групп в эпителии Цк и Ур выявлено значительное повышение уровня экспрессии генов TLR-4 по сравнению с женщинами, не имеющими в настоящее время заболеваний шейки матки. При этом в эпителии Цк зарегистрировано увеличение уровня экспрессии генов в три раза по сравнению с IV группой при  $p < 0,05$  с размахом индивидуальных значений внутри I группы составлял от 11,7 ОЕ до 57,5 ОЕ. Микст-инфекции достоверно не влияли на уровень экспрессии. Уровни экспрессии генов TLR-4 (табл. 1) в Цк пациенток с первой этиологической подгруппой инфекционного процесса в I группе превышали уровни II группы в 4,65 раза. При этом интенсивность экспрессии генов в Ур находилась приблизительно на одном уровне с пациентами с третьей этиологической подгруппой инфекционного процесса. Внутригрупповой анализ показал, что у большинства пациентов I группы при совокупном действии хламидийной инфекцией и микрофлоры наблюдалось одновременное увеличение как TLR-2, так и TLR-4. Анализ уровня экспрессии TLR-4 в I и II группах пациенток с второй и четвертой этиологическими подгруппами инфекционного процесса в сопоставлении с данными IV группы также выявил рост уровня экспрессии при контаминации слизистой оболочки Цк и Ур УПМ. Данный факт объясняется напряженностью иммунного ответа, обусловленного дополнительным поражением УГТ инфекционными патогенами. Низкие уровни экспрессии генов TLR-4 при осложненном инфекционном процессе могут свидетельствовать об отсутствии адекватного иммунного ответа или указывать на вероятность переключения TLR-4 типа иммунного ответа на TLR-2. Низкий уровень экспрессии генов TLR-4 в Цк и Ур ( $3,8 \pm 0,27$  ОЕ и  $2,3 \pm 0,5$  ОЕ) наблюдался у 7 пациенток II группы и у трёх в I группе. Максимальное повышение экспрессии генов TLR-4 в Цк наблюдалось у пациенток с четвертой этиологической подгруппой инфекционного процесса в I группе у 12,1% пациентов, что объяснялось совокупным воздействием бактериальной флоры и патологического процесса.

Устанавливалась взаимосвязь уровня экспрессии генов TLR и микрофлоры Вл. Обнару-

жено достоверное снижение количества лактобацилл в I группе по сравнению с IV группой в пристеночной области (интенсивность колонизации  $6,5 \pm 1,0$  lg КОЕ/г). Бифидобактерии не выявлялись. У 21 обследованных II группы имело место снижение количества лактобацилл до  $6,5 \pm 2,0$  lg КОЕ/г по сравнению с IV группой. Бифидобактерии не выявлялись. У пациенток III и IV групп во Вл в 86,6% и 100% случаев, соответственно, выявлены лактобациллы. У 26 обследованных III группы лактобациллы обнаружены в количестве  $7,5 \pm 1,0$  lg КОЕ/г, бифидобактерии выделялись в 26,6% случаев в количестве  $4,0 \pm 1,5$  lg КОЕ/г. В пристеночной области Вл IV группы доминировали лактобациллы в количестве  $7,5 \pm 1,5$  lg КОЕ/г. Бифидобактерии выявлялись в 40,62% случаев в количестве  $4,6 \pm 0,6$  lg КОЕ/г.

При изучении микрофлоры слизистой оболочки Вл выделено 15 родов микроорганизмов у больных I и II групп и 4 - в IV группе. У больных I и II групп по сравнению с IV группой увеличена общая численность микроорганизмов. В I группе наиболее выраженные дисбиотические нарушения, которые проявлялись в повышении количества обсемененности всех отделов УГТ и в формировании 3-5 компонентных ассоциаций УПМ. Выявлен более широкий спектр УПМ, чем в IV группе. Микрофлора преимущественно представлена гемолитическими стрептококками, энтерококком, стафилококком, частота выявления, которых находилась в пределах 15-20% при интенсивности колонизации 2-6 lg КОЕ/мл. Регистрировалось увеличение общей численности грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae (Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Escherichia coli), их высеваемость достигала 6% при интенсивности колонизации  $4,0-5,7$  lg КОЕ/мл. Изоляты Enterococcus spp. регистрировались в 51,2%. Установлено увеличение общей численности и удельного веса грибов рода Candida spp, Streptococcus spp, Staphylococcus spp, относящихся к коагулазопозитивным стафилококкам. Во II группе больных УПМ биотопа Вл была представлена факультативно-анаэробными микроорганизмами (пептострептококками, зубактериями), коагулазотрицательными стафилококками и энтерококками. Пептострептококки выявлялись у 6,89% обследованных, коагулазоотрицательные стафилококки - в 24,1% случаев в количестве 5-6 lg КОЕ/г в пристеночной области влагалища. Энтерококки

определялись только у 31,0% больных в количестве  $4,5 \pm 1,5$  lg КОЕ/г. У пациенток III и IV групп частота выявления гемолитических стрептококков, энтерококков, стафилококков находилась на высоком, хотя и более низком, чем у пациентов I группы, уровне, с частотой колебания от 3% до 5% при интенсивности колонизации от 1 до 3 lg КОЕ/мл. Наличие УПМ регистрировалось у 30% пациенток III группы и у 6,6% пациенток IV группы (наименьший спектр УПМ). Изоляты *Enterococcus* spp. регистрировались в 2,6% случаев у пациентов III группы и в 0% в IV группе. Из перечисленных микроорганизмов выявлялись грибы рода *Candida* и эпидермальный стафилококк. Следует отметить, что у обследованных IV группы эпидермальный стафилококк выявлялся более чем в 2 раза чаще, чем у больных III группы. Не выявлено зависимости уровней экспрессии генов TLR-2 и TLR-4 от количественных характеристик микрофлоры Вл.

Все пациенты были разделены на клинические группы в зависимости от преобладания грамположительных или грамотрицательных микроорганизмов или количественного содержания одного из этих патогенов  $>10^6$  КОЕ/мл во Вл. Энтеробактерии - *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., а также *P. aeruginosa* могут быть этиологическими патогенами урогенитальных заболеваний. Сравнение уровней экспрессии генов TLR-2 в I, II, III и IV группах с качественной характеристикой микрофлоры не выявил достоверных отличий с учётом наличия грамположительной или грамотрицательной микрофлоры. Однако установлен более высокий уровень экспрессии TLR-4 при наличии грамотрицательных микроорганизмов: кишечной палочки, клебсиелл, энтеробактеров и др. Это связано с тем, что ЛПС грамотрицательных бактерий является природным лигандом активации TLR-4. У 25 пациентов I группы с преобладанием грамположительной флоры (гемолитических

стрептококков, энтерококков, коагулазопозитивных и коагулазоотрицательных стафилококков) уровень экспрессии генов TLR-4 ( $18,63 \pm 2,78$  ОЕ) был достоверно ниже ( $p < 0,01$ ), по сравнению с 13 пациентами той же группы, но имеющих в составе биотопа Вл грамотрицательную микрофлору ( $45,63 \pm 9,54$  ОЕ). Экспрессия генов TLR-4 отражает активность воспалительного процесса, а наличие грамотрицательной микрофлоры может служить неспецифическим маркером воспаления.

### Заключение

Таким образом, у больных урогенитальным хламидиозом установлено повышение экспрессии генов TLR-2 и TLR-4, как в Цк, так и в Ур, которое коррелировало с тяжестью клинических проявлений, зависящей как от хламидий, так и от ассоциатов (возбудителей ИППП и УПМ). При хламидийной инфекции не осложнённый и осложнённый наличием ассоциатов воспалительный процесс в УГТ характеризуется разными типами ответов в отношении экспрессии генов рецепторов. При остром урогенитальном хламидиозе наблюдается более высокий всплеск экспрессии TLR-2 и TLR-4 в Цк и Ур. При хроническом или асимптомном течении экспрессия генов TLR-2 и TLR-4 находится на уровне, намного ниже нормы. Повышение уровня экспрессии генов TLR коррелирует не только с патогенностью ассоциатов, но и тяжестью клинических проявлений воспалительного процесса, что позволяет использовать данный показатель для определения степени активности клеточного звена иммунитета и воспалительного ответа. Различные уровни активации TLR-2 и TLR-4 зависят от качественного состава микробных сообществ, присутствующих на слизистой оболочке УГТ. Наличие разнообразных бактериальных патогенов приводит к гораздо более высокой активации TLR-2, по сравнению с TLR-4.

### Литература

1. Афанасьев С.С., Онищенко Г.Г., Алёшкин В.А. и др. Интерфероновый статус, препараты интерферона в лечении и профилактике инфекционных заболеваний и реабилитация больных. М.: Триада-Х, 2005.
2. Кудрявцева Л.В., Мисюрин О.Ю., Генерозов Э.В. и др. Клиника, диагностика и лечение хламидийной инфекции (пособие для врачей). М., 2001.
3. О совершенствовании контроля за заболеваниями, передаваемыми половым путем. Методические рекомендации. М., 1995.
4. Якубович А.И., Корепанов А.Р. Урогенитальный хламидиоз. Иркутск, 2007.
5. Савичева А.М., Башмакова М.А., Кошелева Н.Г. и др. Хламидийная инфекция в акушерстве и гинекологии (Диагностика, клиника, лечение). Методическое пособие. Санкт-Петербург, ООО «Издательство Н-Л», 2002.
6. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журн. микробиол. 2007; № 4: 93-100.

7. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388-394.
8. Shiraki R., Inoue N., Kawasaki S. et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Tromb. Res.* 2004; №113: 379-385.
9. Schnare M., Rollinghoff M., Qureshi S. Toll-Like Receptors: Sentinels of Host Defence against Bacterial Infection. *Allergy Immunol.* 2006; №139: 75-85.
10. Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999; №11: 443.
11. Brightbill H. D., Libraty D. H., Krutzik S. R. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732.
12. Means T. K., Lien E., Yoshimura A. et al. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 1999; №163: 6748.
13. Underhill D. M., Ozinsky A., Hajjar A. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401:811.