

# Колонизационная резистентность и напряженность факторов врожденного иммунитета слизистых влагалища у пациенток с хроническим эндометритом

Ю.Э.Доброхотова<sup>1</sup>, Л.В.Ганковская<sup>1</sup>, Е.И.Боровкова<sup>1</sup>, С.Ж.Данелян<sup>3</sup>, Свитич О.А.<sup>1</sup>,  
С.А.Залеская<sup>1</sup>, Е.Д.Меркушова<sup>1</sup>, З.С.Зайдиева<sup>3</sup>, В.С.Скальная<sup>3</sup>, Е.М.Хасанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Городская клиническая больница №40 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Изучение эффективности цитокинотерапии у пациенток с хроническим эндометритом на основании показателей колонизационной резистентности и напряженности факторов врожденного иммунитета слизистых влагалища.

**Пациенты и методы.** Обследована 41 пациентка с хроническим эндометритом, средний возраст – 34,6 ± 2,5 лет. Культуральное исследование влагалищного микробиоценоза с оценкой колонизации просветного и пристеночного биотопов, иммунологическое исследование слизистых цервикального канала и влагалища с оценкой экспрессии генов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *TNFα*, *HBD1*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и реакции обратной транскрипции.

**Результаты.** У пациенток с хроническим эндометритом выявлено снижение показателей колонизационной резистентности слизистых влагалища на фоне дисбаланса продукции факторов мукозального иммунитета. Цитокинотерапия приводит к увеличению экспрессии генов *TLR2* и *TNFα* в клетках цервикального канала и влагалища в 1,2 и 1,3 раза (для *TLR2*) и в 1,4 раза (для *TNFα*) и гена *TLR4* в цервикальном канале в 2,3 раза. При исходно высоком уровне после лечения происходит снижение экспрессии *TLR2* в клетках цервикального канала и влагалища в 1,3 и 1,2 раза, гена *TLR4* в слизистой влагалища в 1,5 раза, *TNFα* в слизистой оболочке влагалища и цервикального канала в 1,5 и 1,3 раза соответственно. После терапии отмечено достоверное усиление экспрессии *HBD1* в клетках слизистой оболочки цервикального канала и влагалища в 2,3 и 2 раза в группах с низкой экспрессией и в 1,5 раза в группе с высокой экспрессией гена.

**Заключение.** Цитокинотерапия способствует восстановлению микробиоценоза и повышению колонизационной резистентности слизистых.

**Ключевые слова:** колонизационная резистентность, микробиоценоз, мукозальный иммунитет, фактор некроза опухоли, хронический эндометрит, цитокинотерапия, *TLR-4*, *TLR-2*, *HBD-1*, Суперлимф

**Для цитирования:** Доброхотова Ю.Э., Ганковская Л.В., Боровкова Е.И., Данелян С.Ж., Свитич О.А., Залеская С.А., Меркушова Е.Д., Зайдиева З.С., Скальная В.С., Хасанова Е.М. Колонизационная резистентность и напряженность факторов врожденного иммунитета слизистых влагалища у пациенток с хроническим эндометритом. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019; 18(2): 48–56. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-2-48-56

## Colonization resistance and levels of innate immune factors of the vaginal mucosa in patients with chronic endometritis

Yu.E.Dobrokhotova<sup>1</sup>, L.V.Gankovskaya<sup>1</sup>, E.I.Borovkova<sup>1</sup>, S.Zh.Danelyan<sup>3</sup>, O.A.Svitich<sup>1</sup>,  
S.A.Zalenskaya<sup>1</sup>, E.D.Merkushova<sup>1</sup>, Z.S.Zaydieva<sup>3</sup>, V.S.Skalnaya<sup>3</sup>, E.M.Khasanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>City Clinical Hospital No 40, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

**The objective.** To study the effectiveness of cytokine therapy in patients with chronic endometritis based on the parameters of colonization resistance and levels of innate immune factors of vaginal mucosa.

### Для корреспонденции:

Боровкова Екатерина Игоревна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (495) 434-0543

E-mail: Katyanikitina@mail.ru

Статья поступила 20.02.2019 г., принята к печати 16.04.2019 г.

### For correspondence:

Ekaterina I. Borovkova, MD, PhD, DSc, professor at the department of obstetrics and gynaecology, faculty of medicine, N.I.Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 1 Ostrovityanov str., Moscow, 117997, Russian Federation

Phone: (495) 434-0543

E-mail: Katyanikitina@mail.ru

The article was received 20.02.2019, accepted for publication 16.04.2019

**Patients and methods.** 41 patients with chronic endometritis were examined, mean age –  $34.6 \pm 2.5$  years. Cultural examination of vaginal microbiocenosis with assessment of colonization of the luminal and parietal biotopes, immunological examination of the mucous membranes of the cervical canal and vagina with assessment of the expression of innate immunity genes (*TLR2*, *TLR4*, *TNF $\alpha$* , *HBD1*) were performed by the method of real-time and reverse transcription polymerase chain reaction (PCR).

**Results.** We found that in patients with chronic endometritis the parameters of colonization resistance of vaginal mucosa decreased against the background of the imbalanced production of mucosal immunity factors. Cytokine therapy results in an increase of the *TLR2* and *TNF $\alpha$*  gene expression in cells of the cervical canal and vagina by 1.2 and 1.3 times (for *TLR2*) and by 1.4 times (for *TNF $\alpha$* ), and the *TLR4* gene expression in the cervical canal by 2.3 times. In case of the initially high level, after treatment *TLR2* expression decreases in cells of the cervical canal and vagina by 1.3 and 1.2 times, *TLR4* gene in vaginal mucosa by 1.5 times, *TNF $\alpha$*  in vaginal and cervical mucosa by 1.5 and 1.3 times, respectively. After therapy, a significant enhancement of *HBD1* expression in cells of the mucous membranes of the cervical canal and vagina by 2.3 and 2 times was obtained in groups with low expression and by 1.5 times in the group with high expression of the gene.

**Conclusion.** Cytokine therapy promotes restoration of the microbial community and enhances colonization resistance of the mucous membranes.

*Key words:* colonization resistance, microbiocenosis, mucosal immunity, tumour necrosis factor, chronic endometritis, cytokine therapy, *TLR-4*, *TLR-2*, *HDB-1*, Superlimf

**For citation:** Dobrokhotova Yu.E., Gankovskaya L.V., Borovkova E.I., Danelyan S.Zh., Svitich O.A., Zalesskaya S.A., Merkusheva E.D., Zaydieva Z.S., Skalnaya V.S., Khasanova E.M. Colonization resistance and levels of innate immune factors of the vaginal mucosa in patients with chronic endometritis. *Vopr. ginekol. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2019; 18(2): 48–56. (In Russian). DOI: 10.20953/1726-1678-2019-2-48-56

**Х**ронический эндометрит – гистоморфологический синдром, характеризующийся нарушением пролиферативной и рецептивной способности клеток эндометрия. Основными причинами его развития являются перенесенные бактериальные и вирусные инфекции, а также внутриматочные вмешательства. В большинстве случаев ХЭ протекает бессимптомно. В общей популяции его частота не превышает 8–10%, но в структуре женского бесплодия достигает 65–70% [1].

Диагноз ХЭ устанавливается морфологически и основывается на выявлении плазматических клеток, очагового фиброза стромы, склеротических изменений стенок сосудов и очаговой лимфоцитарной инфильтрации ткани. Для подтверждения диагноза проводится иммуногистохимическое исследование с оценкой количества пиноподий, рецепторов к эстрогенам, прогестерону, пролиферативной активности эпителиоцитов (Ki65) и экспрессии маркера плазматических клеток CD-138 [1, 2].

Достижения науки создают представление о причинах и патогенезе развития эндометрита как о многофакторном процессе, для понимания которого важно подробное изучение механизмов инфицирования, стадийности развития, специфики местного иммунитета и клеточно-гуморальных реакций.

Причинами ХЭ могут быть любые микроорганизмы, обитающие в организме человека. Выделено 27 видов бактерий, множество вирусов, 6 видов грибов, 4 вида простейших. В частности, к безусловным возбудителям относят вирусы простого герпеса, Коксаки, цитомегаловируса, а также такие бактерии, как листерии, трепонемы, микобактерии, хламидии, риккетсии и некоторые виды условно-патогенной флоры (стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, клебсиеллы) [2, 3].

В реализации восходящего пути инфицирования важное значение имеет состояние колонизационной резистентности и местного иммунитета генитального тракта. Местная противомикробная защита обеспечивается сложным комплексом приспособлений, включающих в себя анатомо-физиологические особенности, секреторный иммунитет, фагоци-

тирующие клетки, гуморальные микробицидные факторы и нормальную микрофлору [4].

Колонизационная резистентность подразумевает совокупность механизмов, обеспечивающих постоянство количественного и видового состава нормальной микрофлоры, что предотвращает заселение влагалища патогенными микроорганизмами или чрезмерное размножение условно-патогенных микроорганизмов [5, 6]. Под местным иммунитетом подразумевают невосприимчивость органа или ткани к какому-либо болезнетворному агенту, в то время как макроорганизм в целом остается чувствительным к патогенному действию того же возбудителя. Проблема изучения параметров местного иммунитета продолжает оставаться актуальной. Это объясняется высоким уровнем инфицированности пациенток и необходимостью разработать эффективные препараты, способные «закрыть» входные ворота для возбудителей инфекции.

**Цель** – изучение эффективности цитокинотерапии у пациенток с ХЭ на основании показателей колонизационной резистентности и напряженности факторов врожденного иммунитета слизистых влагалища.

## Пациенты и методы

Проспективное исследование, включившее 41 пациентку.

Критерии включения:

1. возраст пациенток от 25 до 40 лет (средний возраст –  $34,6 \pm 2,5$  лет);
2. морфологически подтвержденный хронический эндометрит;
3. отсутствие значимой соматической, аутоиммунной и эндокринной патологии;
4. согласие пациентки на участие в исследовании;
5. отсутствие беременности;
6. отсутствие аллергических реакций к белкам животного происхождения.

Всем женщинам из выборочной совокупности до начала лечения было проведено микробиологическое исследование

(с оценкой просветной и пристеночной флоры влагалища), а также у них была изучена экспрессия факторов врожденного иммунитета в слизистых влагалища и цервикального канала. После забора материалов проводился курс местной терапии препаратом Суперлимф: по 1 свече (25 ЕД) во влагалище на ночь 20 дней. Эффективность лечения оценивалась на 21-й день по показателям колонизационной резистентности и врожденного иммунитета.

Препарат представляет собой естественный комплекс природных противомикробных пептидов и цитокинов – универсальных стимуляторов иммунной системы с активностью фактора, угнетающего миграцию макрофагов, интерлейкина-1, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли, трансформирующего фактора роста, секретируемых лейкоцитами периферической крови свиньи. Суперлимф является иммуномодулятором и обладает противовирусным и противомикробным действием, стимулирует функциональную активность клеток фагоцитарного ряда (моноцитов и нейтрофилов): активирует фагоцитоз, выработку цитокинов (ИЛ-1, TNF), индуцирует противоопухолевую цитотоксичность макрофагов, способствует гибели внутриклеточных паразитов, регулирует миграцию клеток в очаг воспаления и увеличивает активность естественных киллеров, обладает антиоксидантной активностью, снижает развитие воспалительных реакций, стимулирует регенерацию и эпителизацию раневых дефектов. Согласно официальной инструкции, Суперлимф разрешен во время беременности и показан в составе комплексного лечения бактериальных и вирусных инфекций.

Качественный и количественный анализ микрофлоры влагалища проводился методом комплексного анализа Флороценоз (лаборатория «Гемотест»). Исследование включало изучение просветного и пристеночного биоценоза влагалища. Материал из влагалища брали до проведения мануального исследования, после введения зеркал. Микробиологическое исследование проводилось двукратно: в момент включения в исследование и через 20 дней терапии препаратом Суперлимф. В ходе работы произведено 172 микробиологических исследования. Для оценки состояния просветной флоры забор материала производился из заднего свода влагалища стерильным ватным тампоном, для оценки состояния пристеночной флоры забор материала производился из заднего свода влагалища цервикальной цитощеткой после предварительной обработки стерильным ватным тампоном. Полученный материал помещался в специальные пробирки с транспортной средой и поглотителем кислорода. Пробирки в течение 1,5–2 ч доставляли в лабораторию, где производился посев материала на питательные среды. С помощью стереоскопического микроскопа подсчитывали число различных видов колоний в каждом секторе и рассчитывали количество lg КОЕ/мл.

Изучение экспрессии факторов врожденного иммунитета выполняли на кафедре иммунологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова. В ходе работы использовались наборы для выделения РНК из клинического материала, для проведения обратной транскрипции (ОТ) («Синтол», РФ), ПЦР в присутствии SYBR Green I («Синтол», РФ).

Забор материала проводился при помощи цитощеток из заднего свода влагалища и из цервикального канала, переносился в пробирки и замораживался при температуре  $-25^{\circ}\text{C}$ . В лаборатории в каждую пробирку вносили по 450 мкл лизирующего раствора и 100 мкл суспензии клеток, центрифугировали в течение 5 с при 5 тыс. об/мин, добавляли ресуспендированный сорбент по 25 мкл, центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. В несколько этапов проводили отмывку. Пробирки с сорбентом помещали в термостат при температуре  $60^{\circ}\text{C}$  на 12–15 мин для подсушивания сорбента, добавляли по 50 мкл РНК-буфера. Далее после выдерживания в термостате в течение 3 мин вортексировали, центрифугировали на максимальных оборотах центрифуги (13,4 тыс. об/мин) в течение 1 минуты. Супернатант содержал очищенную РНК.

Реакцию ОТ проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 3 мкл РНК-матрицы, 1 мкл random (шестичленные олигонуклеотиды со случайной последовательностью оснований) («Синтол», РФ) и 9 мкл ddH<sub>2</sub>O. Смесь инкубировали при плюс  $75^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, далее пробирки охлаждали до плюс  $4^{\circ}\text{C}$ . После добавляли 10 мкл смеси, состоящей из 10 × ОТ буфер – 3 мкл, 100 ед. ревертазы M-MLV («Синтол», РФ). Смесь инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Инактивацию проводили при  $92^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. Полученную кДНК хранили при минус  $70^{\circ}\text{C}$ .

Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Исползованные в реакции праймеры были подобраны в программном обеспечении Vector NTI Designer и синтезированы фирмой «Синтол» (РФ). При постановке реакции использовали канал детекции FAM при следующих условиях: 1.  $95^{\circ}\text{C}$  – 300 с, 2.  $60$ – $62^{\circ}\text{C}$  (температура отжига рассчитывалась по правилу Уоллеса) – 40 с, 3.  $95^{\circ}\text{C}$  – 15 с – переход на шаг 2 (45 циклов). Подсчет уровня экспрессии целевых генов оценивался относительно гена домашнего хозяйства –  $\beta$ -актина.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016 и Statistica 6.1. Полученные данные проходили проверку на нормальность распределения, были применены непараметрические критерии для сравнения групп. Сравнение показателей до и после лечения проводилось с использованием критерия Вилкоксона. Результаты считались достоверными при уровне вероятности ошибки  $p < 0,01$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Возраст пациенток находился в пределах от 27 до 40 лет, их соматический статус представлен в табл. 1.

Обращает на себя внимание высокий инфекционный индекс и частые вирусные инфекции в детском возрасте. В структуре экстрагенитальных заболеваний существенное место занимала патология органов мочевыделительной системы (24,3%), в 34,8% имело место сочетание нескольких экстрагенитальных заболеваний.

Данные об особенностях гинекологического анамнеза приведены в табл. 2. Средний возраст менархе у пациенток был  $12 \pm 1,1$  лет, нарушение менструального цикла по типу олигоменореи отмечено у 9,3% женщин.

Таблица 1. Характеристика перенесенных соматических заболеваний

Table 1. Characteristics of a history of somatic diseases

Нозологические формы / Nosological forms	n = 41	
	абс. / abs.	%
Детские инфекции / Paediatric infections	41	100
ОРВИ, грипп / ARVI, influenza	41	100
Вирусный гепатит А / Viral hepatitis A	3	7,3
Заболевания сердечно-сосудистой системы: / Diseases of the cardiovascular system:	6	14,6
варикозная болезнь / varicose veins	5	83,3
артериальная гипертензия / arterial hypertension	1	16,7
Заболевания органов желудочно-кишечного тракта: / Diseases of the gastrointestinal tract:	13	31,7
хронический гастрит / chronic gastritis	10	76,9
хронический колит / chronic colitis	2	15,4
хронический холецистит / chronic cholecystitis	1	7,7
Заболевания органов дыхания: / Diseases of the respiratory organs:	10	24,3
хронический бронхит / chronic bronchitis	2	20
хронический фарингит / chronic pharyngitis	2	20
хронический тонзиллит / chronic tonsillitis	6	60
Заболевания почек и мочевыводящих путей: / Diseases of the kidneys and urinary tract:	10	24,3
хронический пиелонефрит / chronic pyelonephritis	4	40
хронический цистит / chronic cystitis	3	30
мочекаменная болезнь / urolithiasis	3	30

Наиболее распространенными гинекологическими заболеваниями были эктопия шейки матки (36,6%), полип эндометрия (21,9%) и половые инфекции (81,4%). У 14 (34,1%) пациенток в анамнезе отмечены внутриматочные вмешательства по поводу полипа эндометрия и у 21 (51,2%) в связи с искусственными или самопроизвольными абортами.

У большинства пациенток (75,6%) в анамнезе были беременности, которые закончились срочными родами (48,7%), самопроизвольными выкидышами (14,6%) и искусственными абортами (41,6%).

### Результаты микробиологического исследования

У пациенток с хроническим бессимптомным эндометритом в просветном слое влагалища достоверно в большем количестве, чем в пристеночном слое, высевались грибы

Таблица 2. Гинекологический анамнез

Table 2. Gynaecological history

Гинекологические заболевания / Gynaecological diseases	n = 41	
	абс.	%
Хронический сальпингоофорит / Chronic salpingo-oophoritis	7	17
Эктопия шейки матки / Cervical ectropion	15	36,6
Дисфункция яичников / Ovarian dysfunction	4	9,7
Бесплодие (первичное и вторичное) / Infertility (primary and secondary)	41	100
Миома матки / Uterine fibroid	3	7,3
Ретенционные кисты яичников / Retention ovarian cysts	6	14,6
Дисплазия шейки матки / Cervical dysplasia	2	4,8
Хронический эндометрит / Chronic endometritis	41	100
Полип эндометрия / Endometrial polyp	9	21,9
Кандидозный кольпит / Candidal colpitis	17	41,5
Уреаплазмоз / Ureaplasma infection	18	43,9
Вирус папилломы человека / Human papillomavirus	7	17
Гарднереллез / Gardnerella infection	5	12,2
Микоплазмоз / Mycoplasmosis	3	7,3
Трихомониаз / Trichomoniasis	1	2,4

рода *Candida*, кишечная палочка, атопобиум, уреаплазмы и микоплазма хоминис ( $p \leq 0,01$ ). Усиление колонизации от просветного к пристеночному слоям отмечено для гарднереллы вагиналис и семейства стрептококков (табл. 3).

После курса цитокинотерапии выявлены качественные и количественные изменения, проявляющиеся значительным увеличением колоний лактобактерий (как в просветном, так и в пристеночном слоях), появлением коринебактерий, исчезновением в пристеночном слое уреаплаз, гарднереллы вагиналис и кишечных бактерий (см. табл. 3).

На фоне цитокинотерапии отмечено значительное увеличение колонизации слизистых лактобактериями (почти в 3 раза), появление индигенной защитной флоры (коринебактерии) и снижение практически до нуля условно-патогенных микроорганизмов. В связи с тем, что нами не были использованы антибиотики и пробиотики, полученный результат может быть связан с модулирующим эффектом цитокинотерапии.

Согласно теории колонизационной резистентности (КР), слизистые оболочки нестерильных органов обладают инди-

Таблица 3. Интенсивность колонизации микроорганизмами просветного и пристеночного слоев влагалища

Table 3. Intensity of colonization with microorganisms of the luminal and parietal layers of the vagina

Микроорганизмы влагалищного биотопа / Microorganisms of vaginal biotope	Основная подгруппа / Treatment subgroup (n = 41)				K1	K2
	до лечения (lg 5 КОЕ/мл) ± S / before treatment (lg 5 CFU/ml) ± S		после лечения (lg 5 КОЕ/мл) ± S / after treatment (lg 5 CFU/ml) ± S			
	просвет / lumen	пристеночно / parietal	просвет / lumen	пристеночно / parietal		
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,1 ± 0,9	2,5 ± 0,5	9,6 ± 1,3	4,7 ± 1,6	1,2	2,0
<i>Gardnerella vag.</i>	3,7 ± 1,1	4,3 ± 0,7	1 ± 0,2	0	0,9	–
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	–	0,8
<i>Streptococcus spp.</i>	3,5 ± 0,7	4,4 ± 0,7	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0,8	1,5
<i>E. coli</i>	1,4 ± 0,9	0,9 ± 1,5	0	0	1,6	–
<i>Atopobium vaginae</i>	3 ± 0,4	1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0	3	–
<i>Klebsiella pneum.</i>	0	0	1 ± 0,03	0	–	–
<i>Candida spp.</i>	3 ± 0,6	1 ± 0,4	1,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	3	7
<i>Staphylococcus spp.</i>	1,9 ± 0,3	2 ± 0,7	1 ± 0,07	0,3 ± 0,4	0,9	3,3
<i>Ureaplasma parvum</i>	1,6 ± 0,3	0,2 ± 0	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0	8	1
<i>Ureaplasma urealiticum</i>	1,5 ± 0,1	0	1,4 ± 0,8	0	–	–
<i>Mycoplasma hominis</i>	5,2 ± 0,25	0	2,3 ± 0,4	0,5 ± 0,3	–	4,6

K – отношение количества выделенных микроорганизмов в просветном слое к пристеночному (K1 – до лечения; K2 – после лечения); S – выборочное стандартное отклонение.

K – relation of the number of isolated microorganisms in the luminal to parietal layer (K1 – before treatment; K2 – after treatment); S – sample standard deviation.



Таблица 4. Экспрессия генов врожденного иммунитета у пациенток с хроническим эндометритом  
Table 4. Expression of innate immunity genes in patients with chronic endometritis

n = 41	Копии TNF 10 <sup>3</sup> копий/мл / TNF copies 10 <sup>3</sup> copies/ml	Копии TLR2 10 <sup>3</sup> копий/мл / TLR2 copies 10 <sup>3</sup> copies/ml	Копии TLR4 10 <sup>3</sup> копий/мл / TLR4 copies 10 <sup>3</sup> copies/ml	Копии HBD1 10 <sup>3</sup> копий/мл / HBD1 copies 10 <sup>3</sup> copies/ml
До лечения / Before treatment				
влагалище / vagina	3881 ± 214	2007 ± 211	1105 ± 304	1572 ± 102
цервикальный канал / cervical canal	3254 ± 511	1890 ± 396	2002 ± 113	1512 ± 284
После лечения / After treatment				
влагалище / vagina	3189 ± 329	2169 ± 148	1336 ± 110	1771 ± 401
цервикальный канал / cervical canal	2910 ± 684	1855 ± 287	2113 ± 408	2594 ± 247

видуальной способностью противостоять колонизации чужеродными микроорганизмами. Объективным показателем КР слизистых является отсутствие или незначительное количество условно-патогенных и патогенных бактерий.

Результаты микробиологического исследования отобранной группы были проанализированы с точки зрения показателей КР. Под низкой КР понимали присутствие на слизистой оболочке влагалища условно-патогенных бактерий (группы стафилококков, семейства энтеробактерий, грибов и др.) и уровень колонизации лактобактериями от 0 до 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Высокую КР определяли по отсутствию на слизистой перечисленных бактерий, грибов, общему уровню высевания условно-патогенной флоры не более 10<sup>3</sup> КОЕ/мл и высокому уровню содержания лактофлоры – 10<sup>5</sup> КОЕ/мл и более.

Анализ полученных данных (см. табл. 3) выявил, что после проведения курса цитокинотерапии в 3 раза повысился уровень колонизации лактобактериями наравне со значительным снижением титра условно-патогенных микроорганизмов (не выше 10<sup>2</sup> КОЕ/мл).

#### Результаты оценки факторов врожденного иммунитета

Исследование компонентов мукозального иммунитета включало оценку экспрессии генов двух распознающих ре-

цепторов *TLR-4* и *TLR-2* (распознают ДНК и белки оболочки вируса, бактерий) и генов двух эффекторных молекул: цитокина *TNFα* (обладает цитотоксическим действием) и противомикробного пептида *HBD-1* с прямым противовирусным действием.

Было обнаружено, что экспрессия генов врожденного иммунитета в слизистых влагалища и цервикального канала до и после лечения находится на достаточно высоком уровне. После лечения было выявлено достоверное ( $p \leq 0,01$ ) снижение экспрессии гена фактора некроза опухоли как во влагалище, так и в цервикальном канале, повышение концентрации *TLR2* и *TLR4* во влагалище и значительное увеличение уровня *HBD1* как во влагалище, так и в эндцервиксе (табл. 4).

В зависимости от изначальной экспрессии исследуемого гена пациентки были разделены на две группы: с экспрессией ниже среднего (группа 1) и выше среднего значения (группа 2).

За показатель среднего значения экспрессии гена *TLR2* принималась величина, равная 2000 × 10<sup>3</sup> копий /мл. Средний уровень экспрессии гена *TLR2* в ткани цервикального канала до и после лечения составил 3229,775 ± 396 и 4474,606 ± 287 × 10<sup>3</sup> копий/мл соответственно, низкую исходную экспрессию имели 24 пациентки (группа 1), высокую – 17. Анализ полученных данных показал статистически до-

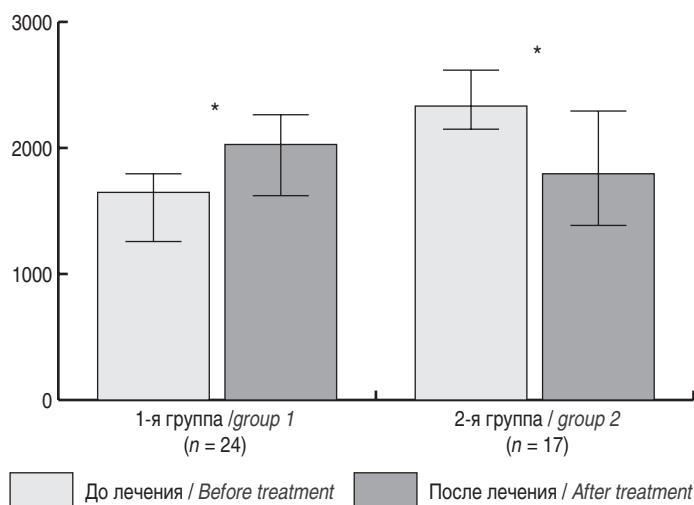


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *TLR2* в ткани цервикального канала в группах до и после лечения (данные представлены в виде медианы и 25–75%). \*различия достоверны ( $p < 0,05$ ), критерий Вилкоксона.

Fig. 1. The level of the *TLR2* gene expression in tissues of the cervical canal in the groups before and after treatment (data are presented as a median and 25–75%). \*differences are significant ( $p < 0.05$ ), Wilcoxon criterion.

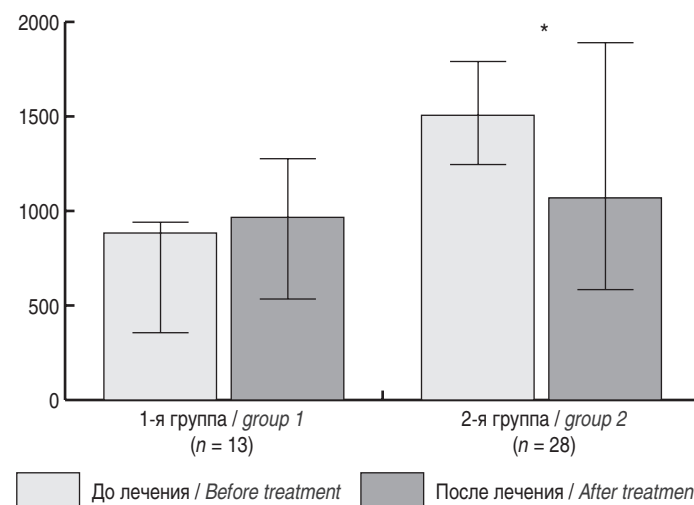


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *TLR4* в образцах ткани цервикального канала в группах до и после лечения (данные представлены в виде медианы и 25–75%). \*различия достоверны ( $p < 0,01$ ), критерий Вилкоксона.

Fig. 2. Level of the *TLR4* gene expression in tissue specimens of the cervical canal in the groups before and after treatment (data are presented as a median and 25–75%). \*differences are significant ( $p < 0.01$ ), Wilcoxon criterion.

стойкое повышение уровня экспрессии гена *TLR2* после лечения в группе с изначально сниженным его количеством (в 1,2 раза) и снижение уровня в 1,3 раза в группе с изначально повышенными показателями (рис. 1).

Уровень экспрессии гена *TLR2* во влагалище увеличивался в 1,3 раза в группе 1 и снижался в 1,2 раза в группе 2 ( $p < 0,01$ , критерий Вилкоксона).

За показатель среднего значения экспрессии гена *TLR4* принималась величина, равная  $1000 \times 10^3$  копий/мл. Было выявлено статистически достоверное снижение уровня экспрессии гена *TLR4* в группе 2 ( $n = 28$ ) в 1,5 раза, при этом в группе 1 ( $n = 13$ ) значения экспрессии до и после лечения не изменялись (рис. 2).

В слизистой оболочке влагалища было зафиксировано статистически достоверное увеличение уровня экспрессии гена *TLR4* в группе 1 в 2,3 раза, а в группе 2 изменений до и после лечения выявлено не было.

За показатель среднего значения экспрессии гена *TNF $\alpha$*  принималась величина, равная  $2000 \times 10$  копий/мл. Анализ полученных данных показал статистически достоверное увеличение уровня экспрессии гена *TNF $\alpha$*  в ткани цервикального канала в группе 1 в 1,4 раза, а в группе 2 – его снижение в 1,3 раза. Уровень экспрессии гена *TNF $\alpha$*  в клетках слизистой оболочки влагалища в группе 1 ( $n = 18$ ) возрастал в 1,4 раза, а в группе 2 ( $n = 23$ ) – снижался в 1,5 раза (рис. 3).

За показатель среднего значения экспрессии гена *HBD1* принималась величина, равная  $1500 \times 10^3$  копий/мл. Анализ данных показал статистически достоверное увеличение уровня экспрессии гена *HBD1* в группе 1 ( $n = 25$ ) в 2,3 раза, в группе 2 ( $n = 16$ ) – в 1,5 раза (рис. 4). У 6 пациенток группы 1 исходные показатели противомикробной защиты (экспрессия гена *HBD1*) были значительно снижены, и применение препарата вызывало увеличение экспрессии *HBD1* в 4–7 раз.

Анализ полученных результатов выявил достоверное увеличение экспрессии гена *HBD1* в слизистой влагалища в группе 1 в 2 раза, а в группе 2 изменений в экспрессии выявлено не было.

Слизь цервикального канала и влагалища содержит иммуноактивные протеины, лактоферрин, лизоцим и др., которые являются первой линией защиты от различных патогенов, препятствуя адгезии микроорганизмов и опосредуя их киллинг [7]. Репертуар цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов преимущественно синтезируется эпителиальными клетками, а также клетками врожденного иммунитета, активация которых обусловлена сигналингом через паттернраспознающие рецепторы, в частности, через Toll-подобные рецепторы. Стимуляция данных рецепторов приводит к выработке про- и противовоспалительных цитокинов, а также секреции спектра противомикробных пептидов [8]. На первом этапе исследования была проведена оценка состояния микробиоценоза влагалища и цервикального канала у пациенток с ХЭ. На основании изучения колонизационной резистентности было показано, что на фоне цитокинотерапии происходит значительное увеличение концентрации лактобактерий (в 3 раза), появляется индигенная защитная флора и снижается до нуля колонизация

биотопа условно-патогенными микроорганизмами. Мы полагаем, что данные результаты связаны с нормализацией цитокинового каскада и факторов врожденного мукозального иммунитета влагалища.

Вторым этапом исследования было определение показателей экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в клетках слизистой оболочки влагалища и цервикального канала. После применения препарата Суперлимф уровень экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* изменялся в зависимости от исходных показателей экспрессии: снижался в группе с высокой экспрессией генов *TLR2* и *TLR4* и увеличивался – в группе с низкой экспрессией. *TLR4* распознают липополисахарид грамотрицательных бактерий, *TLR2* – широкий спектр различных патогенов (белки вирусной оболочки пептидогликаны, липотейхоевые кислоты, а также эндогенные лиганды, такие как HSP60, HSP70, олигосахариды гиалуроновой кислоты и фибриногена). Активация этих рецепторов приводит к включению транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B через MyD88-опосредованный механизм. Также показана роль *TLR4* в регуляции оси таких цитокинов, как MCP-1 и CXCL1, которые обеспечивают активацию макрофагов и их преимущественную дифференцировку в клетки M1 – макрофаги воспалительного фенотипа [8, 9].

На третьем этапе были определены уровни экспрессии генов эффекторных молекул врожденного иммунитета *TNF $\alpha$*  и *HBD1*. На фоне цитокинотерапии в клетках слизистой оболочки цервикального канала и влагалища экспрессия гена

## СУПЕРЛИМФ®

СТАНДАРТИЗИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКС АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ЦИТОКИНОВ

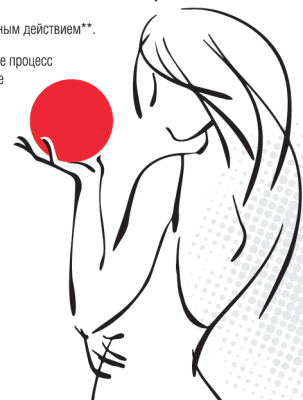
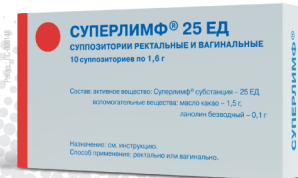
### ЛОКАЛЬНАЯ ЦИТОКИНОТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

- 20 ЛЕТ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
- 12 ЛЕТ УСПЕШНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ
- БОЛЕЕ 150 НАУЧНЫХ РАБОТ ([WWW.DISSERCART.COM](http://WWW.DISSERCART.COM))

• Обладает прямым противобактериальным и противовирусным действием\*\*.

• Быстро ликвидирует воспаление, активирует репаративные процессы, предупреждает грубое рубцевание, стимулирует локальные клеточные и гуморальные механизмы.\*\*\*

• Способен подавлять рост и размножение как *St. aureus* и *E. coli*\*\*\*\*.



### ЗАЩИТА И ВОССТАНОВЛЕНИЕ

КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГЕРПЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА, В ТОМ ЧИСЛЕ, ОСЛОЖНЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ\*.

\*См. также: М. В. Лавренко, В. В. Давыдов, В. В. Сорокин, Д. А. Ткаченко. Эффективность интраназального введения мазка герпеса первого типа комплексной терапии (препарат Суперлимф) и в/в "Уролимф" // Журнал "Урология" – 2005 – № 1 – С. 23-26  
\*\*См. также: В. В. Сорокин, В. В. Давыдов, В. В. Лавренко, В. В. Сорокин, Д. А. Ткаченко. Эффективность интраназального введения мазка герпеса первого типа комплексной терапии (препарат Суперлимф) // Вестник науки и техники. – 2005 – № 1 – С. 23-26  
\*\*\*См. также: В. В. Сорокин, В. В. Давыдов, В. В. Лавренко, В. В. Сорокин, Д. А. Ткаченко. Эффективность интраназального введения мазка герпеса первого типа комплексной терапии (препарат Суперлимф) // Урология и андрология. 2003, том 4 №2, стр. 20-26



ООО «ИИ «Иммунотех»  
105187 г. Москва,  
ул. Щербаковская д. 23 к. 15,  
Телефон: +7(495) 720-40-20  
email: info@immunohelp.ru

Больше информации на сайте  
[www.superlimf.ru](http://www.superlimf.ru)

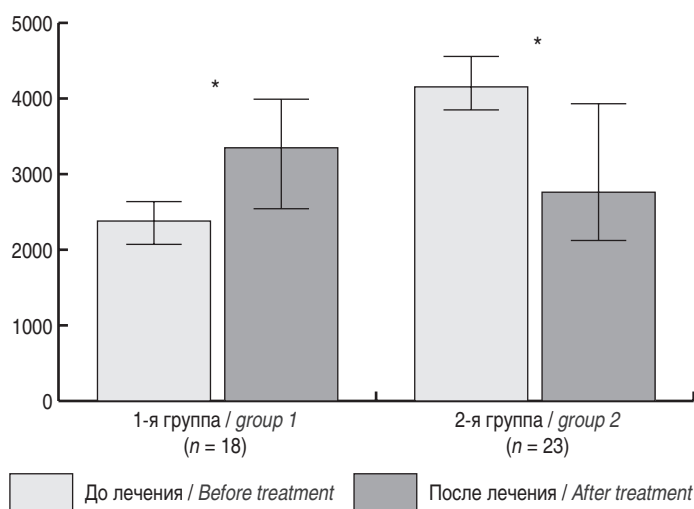


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *TNFα* в группах до и после лечения (данные представлены в виде медианы и 25–75%). \*различия достоверны ( $p < 0,01$ ), критерий Вилкоксона.

Fig. 3. Level of the *TNFα* gene *e* after treatment (data are presented as a median and 25–75%). \*differences are significant ( $p < 0.01$ ), Wilcoxon criterion.

*TNFα* увеличилась в 1,4 раза. Фактор некроза опухоли является одним из основных провоспалительных цитокинов. В высоких концентрациях он участвует в организации очага воспаления, активации клеток врожденного иммунитета, а также в регуляции их пролиферации и дифференцировки. При повышенной выработке *TNFα* возможно преобладание процессов повреждения тканей [8]. Нами было показано, что в группе с изначально повышенной экспрессией *TNFα* наблюдалось статистически значимое ее снижение в 1,5 и 1,3 раза во влагалище и цервикальном канале соответственно.

В клетках слизистой оболочки цервикального канала (группа 1 и группа 2) и влагалища (группа 1) продемонстрировано увеличение экспрессии гена *HBD1*, который играет важную роль в противомикробной защите слизистых оболочек женского урогенитального тракта. После лечения препаратом Суперлимф происходило достоверное усиление экспрессии *HBD1* в клетках цервикального канала и влагалища в 2,3 и 2 раза соответственно в группах с начально низкой экспрессией и в 1,5 раза в группе с высокой экспрессией.

### Заключение

У пациенток с ХЭ отмечено снижение показателей КР слизистых влагалища на фоне дисбаланса продукции факторов мукозального иммунитета. Проведение цитокинотерапии способствует восстановлению микробиоценоза и повышению КР слизистых.

Цитокинотерапия препаратом Суперлимф способствует нормализации работы факторов мукозального иммунитета за счет модулирования экспрессии генов факторов врожденного иммунитета как в клетках слизистой оболочки влагалища, так и в клетках цервикального канала. При изначально сниженной продукции факторов врожденного иммунитета цитокинотерапия приводит к увеличению экспрессии

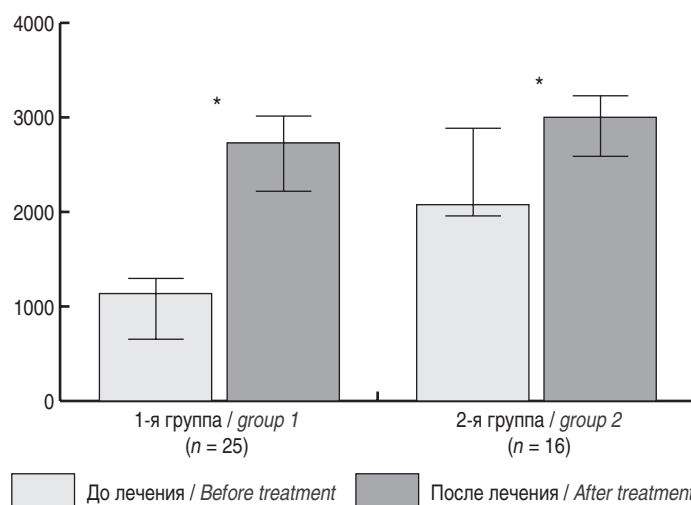


Рис. 4. Уровень экспрессии гена *HBD1* в группах до и после лечения (данные представлены в виде медианы и 25–75%). \*различия достоверны ( $p < 0,04$ ), критерий Вилкоксона.

Fig. 4. Level of the *HBD1* gene expression in the groups before and after treatment (data are presented as a median and 25–75%). \*differences are significant ( $p < 0.04$ ), Wilcoxon criterion.

генов *TLR2* и *TNFα* в клетках слизистых цервикального канала и влагалища в 1,2 и 1,3 раза (для *TLR2*) и в 1,4 раза (для *TNFα*), а также гена *TLR4* в 2,3 раза (в цервикальном канале).

При исходно высоком уровне экспрессии генов, после лечения препаратом Суперлимф происходит снижение экспрессии *TLR2* в клетках слизистой оболочки цервикального канала и влагалища в 1,3 и 1,2 раза, гена *TLR4* в слизистой влагалища в 1,5 раза, *TNFα* в слизистой оболочке влагалища и цервикального канала в 1,5 и 1,3 раза соответственно.

После применения препарата Суперлимф отмечено достоверное усиление экспрессии *HBD1* в клетках слизистой оболочки цервикального канала и влагалища в 2,3 и 2 раза в группах с низкой экспрессией и в 1,5 раза в группе с высокой экспрессией гена.

Таким образом, цитокинотерапия оказывает плеiotропное действие на экспрессию исследуемых генов молекул врожденного иммунитета. Эффект терапии определяется исходными показателями напряженности факторов мукозального иммунитета и носит иммуномодулирующий характер.

Результат цитокинотерапии приводит не только к нормализации экспрессии факторов мукозального иммунитета и улучшению резистентности макроорганизма, но и к нормализации микробиоценоза влагалища и повышению КР слизистых.

### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

### Financial support

No financial support has been provided for this work.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is not conflict of interests.

## Литература

1. Михель фон Вольфф, Петра Штуте. Гинекологическая эндокринология и репродуктивная медицина. М.: МЕДпресс-информ, 2018.
2. Шешукова НА, Боровкова ЕИ, Большакова ОВ. Этиопатогенетические варианты спонтанного выкидыша. Гинекология. 2014;2:84-8.
3. Боровкова ЕИ, Раменская ГВ. Оценка эффективности и безопасности местной терапии неспецифических вагинитов. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2014;13(4):19-23.
4. Замыслова ВП, Боровкова ЛВ, Мотовилова ТМ. Новое в диагностике и лечении хронического эндометрита, ассоциированного с бактериально-вирусными агентами. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019;18(1):42-5. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-1-42-45
5. Доброхотова ЮЭ, Боровкова ЕИ. Прегавивидная подготовка: цели, задачи, возможности. Эффективная фармакотерапия. 2017;13:14-9.
6. Доброхотова ЮЭ, Ганковская ЛВ, Боровкова ЕИ, Залеская СА, Свитич ОА, Филина АБ и др. Совершенствование тактики ведения беременных с дисплазией шейки матки путем коррекции показателей врожденного иммунитета. Акушерство и гинекология. 2018;12:42-9.
7. Amjadi F, Salehi E, Mehdizadeh M, Aflatoonian R. Role of the innate immunity in female reproductive tract. Adv Biomed Res. 2014 Jan 9;3:1. DOI: 10.4103/2277-9175.124626. eCollection 2014.
8. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005 Aug; 206:306-35.
9. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11:373-84.

## References

1. Mikhel' fon Vol'ff, Petra Shtute. Ginekologicheskaya endokrinologiya i reproduktivnaya meditsina. Moscow: "MEDpress-inform" Publ., 2018. (In Russian).
2. Sheshukova NA, Borovkova EI, Bolshakova OV. Etiopathogenic options of spontaneous miscarriage. Gynecology. 2014;2:84-8. (In Russian).
3. Borovkova EI, Ramenskaya GV. Assessment of the effectiveness and safety of local therapy for nonspecific vaginites. Vopr. ginekol. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2014;13(4):19-23. (In Russian).
4. Zamysova VP, Borovkova LV, Motovilova TM. New approaches to diagnosing and treatment of chronic endometritis associated with bacterial and viral infectious agents. Vopr. ginekol. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2019;18(1):42-5. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-1-42-45 (In Russian).
5. Dobrohotova YE, Borovkova Yel. Pregravid Training: Goals, Objective, Opportunities. Effective Pharmacotherapy. 2017;13:14-9. (In Russian).
6. Dobrohotova YE, Gankovskaya LV, Borovkova EI, Zaleskaya SA, Svitich OA, Filina AB, et al. Improvement of management tactics for pregnant women with cervical dysplasia, by correcting innate immunity indicators. Obstetrics and Gynecology. 2018;12:42-9. (In Russian).
7. Amjadi F, Salehi E, Mehdizadeh M, Aflatoonian R. Role of the innate immunity in female reproductive tract. Adv Biomed Res. 2014 Jan 9;3:1. DOI: 10.4103/2277-9175.124626. eCollection 2014.
8. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005 Aug; 206:306-35.
9. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11:373-84.