

Ekspresja hBD-1 i hBD-2 w popłuczynach pochwowo-szyjkowych z dróg rodnych kobiet w stanach zapalnych wywołanych drobnoustrojami

hBD-1 and hBD-2 are expressed in cervico-vaginal lavage in female genital tract due to microbial infections

Wiechula Barbara¹, Cholewa Krzysztof², Ekiel Alicja¹, Romanik Małgorzata¹, Doleżych Hanna¹, Martirosian Gayane^{1*,3}

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

² Katedra i Zakład Biochemii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

³ Katedra Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Cel pracy: Określenie wpływu drobnoustrojów na obecność wybranych ludzkich β -defensyn (hBD-1, hBD-2) poprzez ocenę ilościową w popłuczynach pochwowo-szyjkowych (CVL – cervico-vaginal lavage) kobiet z: kandydią, chłamydiazą i innymi zakażeniami bakteryjnymi.

Materiał i metody: β -defensyny były wykrywane ilościowo za pomocą RT-PCR (7000 Taqman, Applied Biosystems) w popłuczynach pochwowo-szyjkowych pobranych od 120 (79 – grupa badana i 41 – grupa kontrolna) nieciążarnych kobiet w wieku 18-40 (średnia wieku 28,5 \pm 6,29). Pacjentki z grupy badanej były podzielone na trzy podgrupy na podstawie diagnozy klinicznej i mikrobiologicznej: kobiety z kandydią (n=13); z chłamydiazą (n=13) i innymi zakażeniami bakteryjnymi (n=12).

Wyniki: Największą liczbę kopii/ μ g całkowitego RNA hBD-1 zaobserwowano w grupie z zakażeniem bakteryjnym oraz kandydią (odpowiednio 335,84 i 320,10), a hBD-2 – w chłamydiozie. Różnica pomiędzy liczbą kopii hBD-1/ μ g całkowitego RNA w grupach: z kandydią, z chłamydiazą, oraz w grupie, w której wyhodowano potencjalnie patogeniczne bakterie była istotna statystycznie; dla hBD-2 znamienność statystyczną odnotowano w chłamydiozie.

Wnioski: Zakażenie *Chlamydia trachomatis* pobudza znacząco wydzielanie hBD-2. Zakażenia *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* oraz bakteryjne indukują zmienny wzrost hBD-1.

Słowa kluczowe: **beta-defensyny / popłuczyny pochwove / hBD-1 / hBD-2 / stan zapalny szyjki macicy / stan zapalny pochwy /**

Adres do korespondencji:

Gayane Martirosian

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Śląski Uniwersytet Medyczny

40-752 Katowice, ul. Medyków 18

tel./fax: 32-25-26-075

e-mail: gmartir@sum.edu.pl

Otrzymano: 05.06.2009

Zaakceptowano do druku: 30.03.2010

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate and compare concentration of selected human β -defensins (hBD-1, hBD-2) in cervico-vaginal lavage (CVL), obtained from women with candidiasis, chlamydia and other bacterial infections.

Material and methods: β -defensins were detected quantitatively by RT-PCR (7000 Taqman, Applied Biosystems) in cervico-vaginal lavage collected from 120 (79 women in the study group and 41 controls) non-pregnant women, aged 18-40 (mean age 28.5 ± 6.29). The study group patients were divided into three subgroups on the basis of clinical and microbiological diagnosis: women with candidiasis ($n=13$); with chlamydia ($n=13$), and with other bacterial infections ($n=12$).

Results: The highest count of hBD-1 RNA copies was found in women with bacterial infections and candidiasis (335.84 and 320.10 respectively), and hBD-2 – with chlamydia. The difference between RNA copies of hBD-1/ μ g in candidiasis, chlamydia and bacterial pathogens was statistically significant; for hBD-2 only in case of chlamydia.

Conclusions: Chlamydia trachomatis infection activates the production of hBD-2. Candida albicans, Chlamydia trachomatis, and bacterial pathogens induced variable increases of hBD-1 concentration.

Key words: **beta-defensins / vaginal lavage / hBD-1 protein / hBD-2 protein / cervicitis / vaginitis /**

Wstęp

β -defensyny należą do grupy peptydów antydrobnoustrojowych (AMP – antimicrobial peptide) wydzielanych w odpowiedzi na zakażenie drobnoustrojami, mających zdolność do zabijania lub hamowania wzrostu mikroorganizmów (bakterii, grzybów i wirusów osłonkowych), stanowiąc tym samym istotną część wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Defensyny występują głównie w ziarnach azurofilnych neutrofilów. Zawierają sześć cystein związanych mostkami dwusiarczkowymi w potrójnie skręconej strukturze konformacji przestrzennej [1].

Do ludzkich β -defensyn należą: hBD-1 (human β -defensin) wytwarzane przez komórki nabłonka min. dróg rodnych kobiet, hBD-2 i hBD-3 – produkowane przez keratynocyty (w reakcjach zapalnych) oraz hBD5-6 – pochodzące z jelitowych komórek Panetha [2, 3, 4].

Działanie antydrobnoustrojowe defensyn jest wybiórcze: indukcja ekspresji hBD-2 i względna tolerancja umożliwia niektórym bakteriom przetrwanie i modulację ekspresji hBD-2, zaś inne drobnoustroje jej nie pobudzają i w ten sposób mogą unikać działania wrodzonych mechanizmów odpornościowych, a w konsekwencji wywoływać zakażenie [5].

Narządy płciowe kobiet z uwagi na swoje funkcje i położenie anatomiczne są predysponowane do zakażeń i rozwoju stanów zapalnych. Zmiany zapalne w obrębie szyjki macicy i/lub pochwy ze względu na uporczywe objawy (świąd, upławy) są najczęstszą przyczyną zgłaszania się kobiet do ginekologa. Ze względu na etiologię zmiany zapalne można podzielić na infekcyjne (bakteryjne i niebakteryjne) i nieinfekcyjne. Do zakażenia dochodzi w przypadku zdominowania flory fizjologicznej dróg rodnych przez wnikające mikroorganizmy, zaś do jego rozwoju predysponuje zaburzenie mechanizmu samooczyszczania pochwy, w którym istotną rolę odgrywają pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* – główny składnik flory fizjologicznej dróg rodnych [6].

Zmiany w obrębie komórek nabłonka jak i czynniki wytwarzane w miejscu zakażenia mogą być charakterystyczne dla poszczególnych drobnoustrojów.

Czynniki etiologicznymi stanów zapalnych dróg rodnych kobiet są m.in.: *Candida albicans* (*C. albicans*), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), GBS (*Group B Streptococci*),

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Trichomonas vaginalis* i mykoplazmy urogenitalne. Około 35% stanów zapalnych w obrębie dróg rodnych kobiet w Polsce powodowane jest przez grzyby drożdżopodobne, głównie *C. albicans* (80-95%), a 20-40% przez *C. trachomatis* [7, 8, 9, 10].

Pojawienie się wieloopornych szczepów szpitalnych wywołało wzrost zapotrzebowania na nowe leki, skuteczne w leczeniu zakażeń. W związku z tym wiele dużych firm farmaceutycznych prowadzi intensywne badania nad zastosowaniem AMP w terapii różnych schorzeń, bowiem niezależnie od bezpośredniego działania antydrobnoustrojowego, białka te pełnią ważną rolę modulującą układ odpornościowy, zarówno w fazie nieswoistej jak i swoistej oraz wykazują zdolność do neutralizowania czynników wyzwalających objawy wstrząsu toksycznego, a także regulacji jego przebiegu.

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu drobnoustrojów na obecność wybranych β -defensyn (hBD-1, hBD-2) poprzez ich ocenę ilościową w popłuczynach pochwowo-szyjkowych (CVL – cervico-vaginal lavage) kobiet z: kandydią, chlamydią i innymi zakażeniami bakteryjnymi.

Materiał i metody

Badaniami objęto materiały pobrane od 120 nieciążarnych kobiet w wieku 18-40 lat (średnia wieku 28,5), pacjentek pozostających pod opieką poradni K lub hospitalizowanych (zgoda Komisji Bioetycznej SUM nr NN-6501-113/04).

Kryteriami włączenia do badania były także faza lutealna cyklu miesięczkowego (15-28 dzień cyklu), rozpoznany stan zapalny pochwy i/lub szyjki macicy przez lekarza ginekologa.

Kryteriami wyłączenia z badań były: brak zgody pacjentki na przeprowadzenie badań, stosowanie przez pacjentkę antybiotyków, chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i/lub przeciwgrzybiczych doustnie lub dopochwowo 3 tygodnie przed badaniem, miesiączka, ciąża, niepowstrzymanie się od stosunków płciowych na 3 dni przed badaniem, stwierdzona choroba nowotworowa u pacjentki, cukrzyca lub schorzenia autoimmunologiczne.

Przebadano również grupę zdrowych kobiet – ochotniczek bez stwierdzonego stanu zapalnego pochwy i/lub szyjki macicy (grupa kontrolna).

Grupę badaną stanowiło 79 kobiet – średnia wieku 28,7 lat, grupę kontrolną – 41 zdrowych kobiet (średnia wieku 28,0 lat). Na podstawie wywiadu i badania klinicznego grupę badaną podzielono na trzy podgrupy:

1. pacjentki z podejrzeniem zakażenia *Candida* spp. – obecność białawo-kremowych upławów, stanu zapalnego błony śluzowej pochwy, pH pochwy $\leq 4,5$ oraz test aminowy ujemny (n=22),
2. pacjentki z podejrzeniem zakażenia *Chlamydia trachomatis* – obecność śluzowo-ropnego zapalenia szyjki macicy z ektopią lub bez, pH pochwy $\geq 4,5$ oraz test aminowy ujemny (n=22),
3. pacjentki z podejrzeniem AV (kryteria Dondersa – stan zapalny śluzówki pochwy, ropne żółtawe upławy, pH pochwy $\geq 4,5$ oraz test aminowy ujemny) i BV (3 kryteria Amsela – białawo-szare upławy, pH pochwy $\geq 4,5$ oraz test aminowy dodatni) (n=35) [11, 12].

U wszystkich kobiet pobrano wymazy z tylnego sklepienia pochwy i szyjki macicy oraz popłuczyny pochwowo-szyjkowe.

Hodowlę bakterii i grzybów przeprowadzono zgodnie z zasadami obowiązującymi w mikrobiologii. Wymaz z pochwy wykorzystano do wykluczenia obecności mykoplazm urogenitalnych z użyciem Mycoplasma IST 2 (bioMérieux, Francja), zaś wymazy z szyjki macicy do wykonania testu Chlamydia Direct IF (bioMérieux, Francja) na obecność antygeny *Chlamydia trachomatis* metodą immunofluorescencji bezpośredniej zgodnie z zaleceniami producenta.

U pacjentek wykonano również badanie w kierunku wagi-nozy bakteryjnej przeprowadzone w oparciu o kryteria Amsela i Nugenta, a także wykluczono obecność *Trichomonas vaginalis* [12, 13].

Popłuczyny pochwowo-szyjkowe otrzymywano poprzez wprowadzenie 5ml PBS jałową strzykawką do pochwy i ponownej aspiracji płynnej zawartości. Uzyskane popłuczyny poddano wirowaniu przy x1000obr./min. przez 10min. w temperaturze 4°C. Z osadu uzyskanego po odwirowaniu CVL wyizolowano RNA metodą Chomczyńskiego i Sacchi [14]. Zawartość wyekstrahowanego RNA zmierzono spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru Gene Quant II (Amersham Biosciences Inc., USA), po czym wszystkie próbki doprowadzono do 0,2µg/µl RNA.

Otrzymany podczas ekstrakcji RNA stanowił matrycę w reakcji RT-PCR, którą przeprowadzono z użyciem aparatu ABI Prism 7000 Taqman (Applied Biosystems, USA).

We wszystkich badanych próbkach wykonano również reakcję RT-PCR dla β-aktyny (TaqMan® DNA Template Reagents, Applied Biosystems, USA), która pozwala na wykluczenie wyników fałszywie ujemnych.

Każdą z reakcji przeprowadzono w dwóch powtórzeniach; wyniki uśredniono. Identyfikację produktów amplifikacji przeprowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym.

Wykorzystano następujące sondy i primery:

- dla hBD-1
primer forward 5' TGTCTGAGATGGCCTCAGGTGG 3'
primer reverse 5' TTGGCCTTCCCTCTGTAACAGGTC 3'
sonda 5' TGCGTCAGCAGTGGAGGGCAATGTC 3'

- dla hBD-2
primer forward 5' ATCCAGTCTTTTGGCCCTAGAAGGT 3'
primer reverse 5' GGCTTTTTGCAGCATTGTTTC 3'
sonda 5' AACAAATTGGACCTGTGGTCTCCC 3'

Do wykonania oznaczenia użyto TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems, USA). Amplifikacja genów kodujących β-defensyny przeprowadzona była w następujących warunkach termicznych:

RT – 48°C przez 30 min.
PCR – 95°C w ciągu 10 min.
– 95°C przez 15 s
– 60°C przez 1 min.
– 72°C przez 10 min. } 40 cykli

Do obliczeń statystycznych użyto programu Statistica 6.1 (Statsoft, USA).

Wyniki

Grzyby z rodzaju *Candida* (głównie *C. albicans*, poza tym 1 szczep *C. sake* i 2 szczepy *Candida* spp.), wyhodowano u 13 z 22 kobiet (59,1%) z objawami klinicznymi kandydiazy, *Chlamydia trachomatis* stwierdzono u 13 z 22 kobiet (59,1%) z klinicznym rozpoznaniem chlamydiozy, u kobiet z podejrzeniem zakażenia bakteryjnego w 7 przypadkach wyhodowano GBS (20%), w 5 – *Enterococcus faecalis* (14,3%). W pozostałych przypadkach nie wyhodowano drobnoustrojów potencjalnie patogennych.

Największą średnią liczbę kopii na µg całkowitego RNA hBD-1 zaobserwowano w grupie kobiet z zakażeniem bakteryjnym oraz kobiet, u których wyhodowano *C. albicans* (odpowiednio 335,84 i 320,10 kopii/µg całkowitego RNA). Największą średnią liczbę kopii na µg całkowitego RNA hBD-2 uzyskano w przypadku zakażenia *C. trachomatis* (2117,31 kopii/µg całkowitego RNA). Szczegółowe wyniki przedstawiają ryciny I i II.

Średnia liczba kopii hBD-1 na µg całkowitego RNA w grupach: z dodatnim wynikiem posiewu w kierunku *C. albicans*, z dodatnim wynikiem badania w kierunku *C. trachomatis*, oraz w grupie kobiet, u których wyhodowano z wymazów z pochwy bakterie potencjalnie patogenne, w porównaniu z grupą kontrolną była istotna statystycznie (wartość p wynosiła odpowiednio: <0,01, 0,03, 0,02).

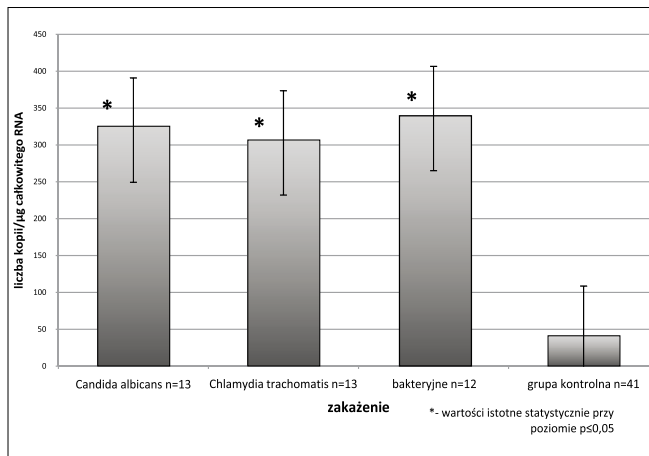
W przypadku hBD-2 znamienność statystyczną odnotowano tylko w grupie kobiet z dodatnim wynikiem badania w kierunku *C. trachomatis* (p<0,01).

Dyskusja

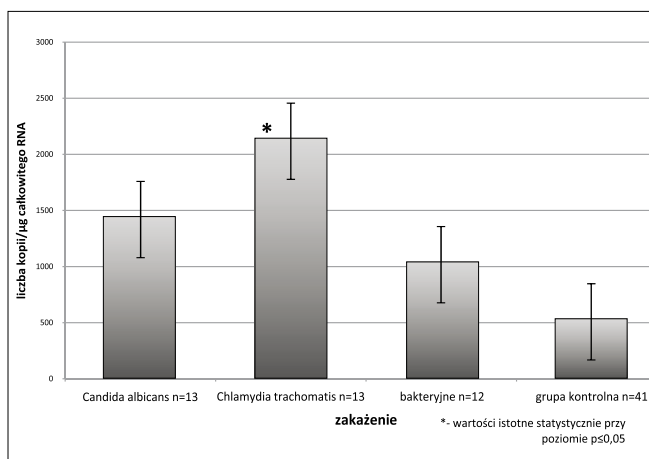
Niewiele jest doniesień literaturowych na temat roli β-defensyn w układzie rozrodczym kobiet z istniejącym stanem zapalnym.

W naszych badaniach w grupie kontrolnej zaobserwowano znacznie niższą liczbę kopii/µg całkowitego RNA dla hBD-1 (średnio 37,96) niż hBD-2 – średnio 507,74 kopii. Również badania Valore i wsp. wykazały bardzo niski poziom hBD-1 (średnie stężenie wynosiło 0,004µg/ml), zaś poziom hBD-2 był wyższy i wynosił średnio 0,57µg/ml podczas badań wydzieliny pochwy zdrowych kobiet pobranej przy pomocy tamponów [4]. Badania tego zespołu wykazały znaczące pobudzenie syntezy mRNA hBD-2 przez *Lactobacillus jensenii*, typowego składnika flory fizjologicznej pochwy, w hodowli *in vitro* ludzkiego nabłonka pochwy, co może być przyczyną zróżnicowania poziomu tych defensyn w warunkach fizjologicznych.

Wiechula B, et al.



Rycina 1. Analiza liczby kopii hBD-1 w popłuczynach pochwowo-szyjkowych z wykorzystaniem RT-PCR.



Rycina 2. Analiza liczby kopii hBD-2 w popłuczynach pochwowo-szyjkowych z wykorzystaniem RT-PCR.

W stanach zapalnych nasze badania wykazały zróżnicowanie poziomu ekspresji obu badanych defensyn w zależności od czynnika etiologicznego zapalenia, co potwierdzają również spostrzeżenia innych badaczy. W badaniach Valore i wsp. w przypadku waginozy bakteryjnej w wydzielinie pochwy prawie wszystkie rodzaje AMP wykazywały dwu- do czterokrotnie niższe wartości w porównaniu z grupą kontrolną oraz z pacjentkami z kandydią pochwy i sromu, zaś badania Fan i wsp. wykazały, że stężenia hBD-2 u kobiet z BV były znacząco wyższe ($p < 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej [15, 16].

BV charakteryzuje się zmianą stosunków ilościowych i jakościowych mikroflory pochwy, jest także związana z miejscowym upośledzeniem funkcjonowania wrodzonego systemu odpornościowego stąd może wynikać rozbieżność uzyskanych przez ww. badaczy wyników. Badania Valore i wsp. wykazały również wyższe stężenie hBD-2 w przypadku pacjentek z kandydią w porównaniu z grupą kontrolną [15].

Również nasze badania wykazały zwiększoną ekspresję hBD-2 w przypadku zakażeń grzybiczych w porównaniu z zakażeniami innymi bakteriami oraz grupą kontrolną, jednak nie była to wartość znamienna statystycznie.

Znamienność statystyczną uzyskaliśmy w przypadku hBD-2 w zakażeniach *C. trachomatis*, jednak brak jest doniesień literaturowych na ten temat.

Zaobserwowana przez nas zmienność ekspresji hBD-1 i hBD-2 w CVL wynika z faktu, iż wydzielanie defensyn jest ściśle uwarunkowane budową drobnoustroju (w głównej mierze zawartością LPS i peptydoglikanów w ścianach komórkowych, bowiem niska zawartość ułatwia działanie AMP), a także jego właściwościami patogennymi, takimi jak stopień inwazyjności oraz zdolność do wydzielania toksyn powodujących uszkodzenie komórki, jak również obecnością elementów dodatkowych: strzępek, otoczek, czy witek, które utrudniają działanie komórek żernych lub dopełniacza.

Wnioski

1. Zakażenie *Chlamydia trachomatis* pobudza znacząco wydzielanie hBD-2.
2. Zakażenia *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* oraz bakteryjne indukują zmienny wzrost hBD-1.

Piśmiennictwo

1. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 2000, 1, 141-150.
2. Jones D, Bevins C. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem.* 1992, 267, 23216-23225.
3. Harder J, Bartels J, Christophers E, [et al.]. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997, 387, 861.
4. Valore E, Park C, Igrati S, [et al.]. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 561-568.
5. Dinulos J, Mentele L, Fredericks L, [et al.]. Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003, 10, 161-166.
6. Strus M, Malinowska M. Zakres antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na czynniki etiologiczne waginozy bakteryjnej. *Med Dośw Mikrobiol.* 1999, 51, 47-57.
7. Giedrys-Kalemba S, Wydra EM, Hałasa J, [i wsp.]. Biocenoza pochwy a zakażenia *Chlamydia trachomatis*. *Med Dośw.* 1994, 46, 73-77.
8. Choroszy-Król I, Ruczkowska J, Kowal A, [i wsp.]. Wykrywanie *Chlamydia trachomatis* w próbkach moczu za pomocą ligazowej reakcji łańcuchowej (LCR). *Adv Clin Exp Med.* 2000, 3, 245-250.
9. Gołąb-Lipińska M, Kurnatowska A. Niektóre aspekty zarażeń wieloogniskowych grzybami związanych z narządami płciowymi kobiet. *Wiad Parazytol.* 2001, 47, Suppl 1, 137-142.
10. Zbroch T, Knapp P, Błońska E, [i wsp.]. Wpływ zakażenia *Chlamydia trachomatis* i bacterial vaginosis oraz stylu życia na występowanie zmian szyjki macicy. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 538-544.
11. Donders G, Vereecken A, Bosmans E, [et al.]. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG.* 2002, 109, 34-43.
12. Amsel R, Totten P, Spiegel C, [et al.]. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983, 74, 14-22.
13. Nugent R, Krohn M, Hillier S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991, 29, 297-301.
14. Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162, 156-159.
15. Valore E, Wiley D, Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infect Immun.* 2006, 74, 5693-5702.
16. Fan S, Liu X, Liao Q. Human defensins and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008, 103, 50-54.