

РОЛЬ АДГЕЗИВНОЙ И ЦИТОКИНОВОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО ПОСТЭРАДИКАЦИОННОГО УРЕТРИТА У МУЖЧИН, ИНДУЦИРОВАННОГО *S. TRACHOMATIS*, *U. UREALYTICUM*, *M. GENITALIUM*

М.Р. Анфилова

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Введение. Несмотря на то что иммунная реакция запускается антигенными структурами микроорганизмов, их элиминация (естественная или в результате антимикробной терапии) не всегда способствует её затуханию. Так, почти у 25% мужчин с не гонококковым уретритом (НГУ), вызванным *S. trachomatis*, *U. urealyticum* или *M. genitalium*, после окончания курса антимикробной терапии (АМТ), симптомы могут сохраняться даже при подтверждённой эрадикации патогена [1, 2]. Если механизмы возникновения уретральных симптомов в присутствии патогенных бактерий достаточно детально изучены, то причины их персистенции после элиминации инфекционных индукторов иммунной реакции всё ещё не установлены. А это в значительной степени затрудняет разработку методов коррекции.

Установлено, что развитие симптомов уретрита сопряжено с усилением продукции определённых сигнальных молекул. В частности, Yasumoto R. et al. [3] обнаруживали в моче у женщин с уретральным синдромом повышенные концентрации интерлейкина-6 (ИЛ-6) и ИЛ-8. С другой стороны, у большинства из них устранение симптомов под действием антибиотика сопровождалось элиминацией из мочи соответствующих ИЛ. Также сообщалось, что у мужчин с неспецифическим уретритом выраженность симптомов коррелировала с уровнем ИЛ-8 в первой порции мочи [4]. Повышение концентрации этого же цитокина было отмечено в уретральных материалах от пациентов с хламидийным уретритом [5].

Источниками этих сигнальных молекул могут быть не только иммунокомпетентные клетки (дендритные клетки, моноциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты), но и эпителий слизистых оболочек. Реагируя на инфицирование усилением продукции цитокинов и молекул межклеточной адгезии,

эпителиальные клетки участвуют в регуляции местной иммунной реакции. При этом интенсивность синтеза сигнальных молекул зависит от величины микробной нагрузки и инвазивности микроорганизма [6, 7]. В одном из исследований [6] после 2-часовой инкубации с патогенными бактериями в культуре эпителиальных клеток дёсен (независимо от вида возбудителя) регистрировалось усиление экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) ИЛ-8 и молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1). Следует отметить, что концентрации ИЛ-8 и ICAM-1 продолжали повышаться ещё некоторое время (около 12 часов) даже в отсутствие контакта с бактериями, а затем постепенно снижались. Однако для возвращения к исходному (до инфицирования) уровню продукции потребовалось 26 часов. Усилением экспрессии ICAM-1 отвечали на инфицирование *Neisseria gonorrhoeae* также эпителиальные клетки аденокарциномы эндометрия (HEC-1-B) и цервикальной карциномы (ME-180) [7]. Интересно, что нейтрализация фактора некроза опухоли-6 (ФНО-6), являющегося агонистом ICAM-1, не влияла на это усиление экспрессии.

Показано, что антигенные структуры микроорганизмов индуцируют синтез провоспалительных сигнальных молекул эпителиальными клетками путём активации (фосфорилирования) транскрипционных факторов (ядерный фактор κВ «каппа-би» (ЯФ-κВ), активатор протеина-1, ЯФ-ИЛ-6), и этот процесс запускается после взаимодействия с толл-подобными рецепторами (ТПР). Так, эпителиальные клетки утрачивают способность продуцировать ИЛ-6 и ФНО-6 в ответ на обработку смесью мембранных липопротеинов *M. genitalium* если ТПР-1, ТПР-2, ТПР-6 заблокированы [8]. Осуществляя контроль за транскрипцией генов иммунного ответа, ЯФ-κВ играет ключевую роль в регуляции как врождённого, так и приобретённого иммунного ответа

и может быть вовлечён в патогенез персистенции симптомов уретрита [8–11].

Учитывая, что экспрессия цитокинов и молекул межклеточной адгезии активизируется универсальным индуктором, в качестве которого выступает ЯФ-кВ, нами было проведено исследование местной адгезиновой регуляции иммунной реакции у пациентов с персистенцией симптомов уретрита, несмотря на подтверждённую эрадикацию патогенных бактерий, которые его вызвали (*C. trachomatis*, *U. urealyticum* или *M. genitalium*).

Цель исследования: 1) изучить роль растворимых молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM) в патогенезе персистирующего НГУ; 2) определить возможную связь между содержанием в уретральных смывах молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM) и цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8).

Материалы и методы исследования. Из общего числа мужчин, прошедших один курс стандартной АМТ в соответствии с рекомендациями IUSTI-2016 [1] (доксциклин 100 мг 2 раза в день per os 7 дней при хламидийной и уреаплазменной этиологии НГУ и азитромицин 500 мг внутрь однократно и затем 250 мг внутрь однократно 4 дня по поводу острого уретрита микоплазменной этиологии) с подтверждённой методом ПЦР эрадикацией патогена, были отобраны две группы (1:1): группа ИЗЛЧ (n=44) – отсутствие симптомов уретрита на 30±2 день после завершения АМТ и группа ПРСТ (n=44) – наличие у пациента хотя бы одного из ключевых уретральных симптомов (выделения, дискомфорт, поллакиурия, лейкорея) на 30±2 дня после завершения АМТ.

В соответствии с планом исследования у пациентов обеих групп определялись концентрации растворимых молекул межклеточной адгезии (ICAM-1 и VCAM) и цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8) в уретральных смывах. Кроме того, у пациентов группы ПРСТ оценивались симптомы уретрита с использованием валидированной анкеты [12].

Концентрация ИЛ-6, ИЛ-8 в уретральных смывах определялась посредством иммуноферментного анализа с применением стандартных коммерческих тест-систем фирмы IBL-International GmbH (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация ICAM-1, VCAM определялась методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием стандартных коммерческих тест-систем фирм Bender MedSystems GmbH (Австрия) и IBL в соответствии с рекомендациями производителей.

Уретральные смывы получали путём введения в уретру 1 мл стерильного физиологического раствора комнатной температуры, который после 1-минутной экспозиции собирался в стерильную пробирку и замораживался при температуре минус 80 °С. Смывы собирались утром до первого мочеиспускания.

Статистический анализ. Выборочная совокупность составила 88 наблюдений. Уровень значимости принимался не выше 0,05. Для оценки достоверности межгрупповых различий по медианным концентрациям ИЛ-6, ИЛ-8, ICAM-1, VCAM использовали критерий 5ШБТ.

Результаты и их обсуждение. При межгрупповых сравнениях было установлено, что в группе ПРСТ медианные значения концентраций ICAM-1, VCAM, ИЛ-6 и ИЛ-8 статистически достоверно превышали таковые в группе ИЗЛЧ (рис. 1, 2; табл. 1, 2).

Исследования особенностей взаимодействия молекулярных и клеточных элементов иммунной реакции, инициированной такими облигатными внутриклеточными патогенами, как *C. trachomatis*, *U. urealyticum* или *M. genitalium*, и эпителия уретры должны дать ответ на ключевой вопрос – почему в ряде случаев воспаление не затухает, несмотря на элиминацию антигенных структур, способствуя сохранению симптомов.

Анализируя литературные источники, мы выявили интересный феномен, который, по нашему мнению, может быть морфологическим субстратом персистирующего уретрита. Он был описан Taylor-Robinson D.V. и соавт. [13], и заключается в формировании длительносохраняющихся лимфоцитарных инфильтратов в подслизистом слое уретры (при отсутствии полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в её просвете) у шимпанзе, перенесшего острый хламидийный уретрит.

Очевидно, что для поддержания лимфоцитарной инфильтрации в подслизистом слое уретры необходим определённый тип цитокиновой и адгезиновой сигнализации. Кроме того, этот тип сигнализации должен сохраняться в течение длительного периода времени после удаления антигенной нагрузки. О способности эпителиальных клеток эндоцервикса отвечать продолжительной секрецией цитокинов с хемоаттрактантной активностью (ИЛ-8) в условиях низкой антигенной нагрузки *M. genitalium* сообщают McGowan C.L. и соавт. [14]. Тем не менее, информация о взаимодействии цитокиновых и адгезиновых мессенджеров иммунной реакции в слизистой уретры в отсутствие антигенного индуктора отсутствует.

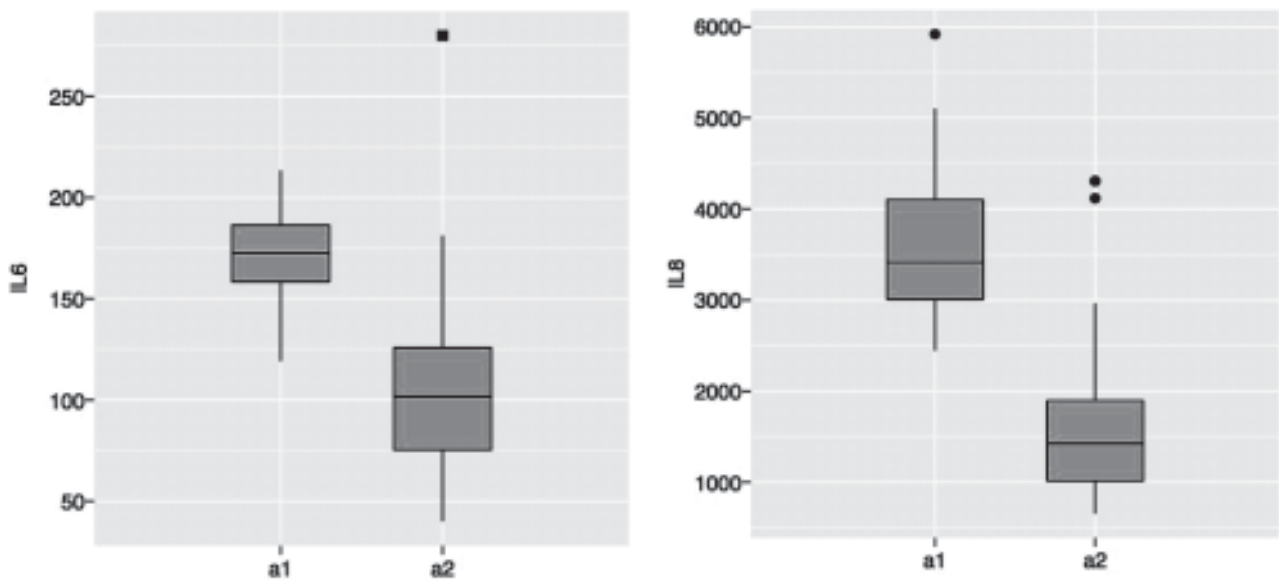


Рис. 1. Распределение пациентов с наличием и отсутствием уретральных симптомов после курса АМТ по концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 (pg/ml) в уретральных смывах (a1 – группа ПРСТ, a2 – группа ИЗЛЧ)

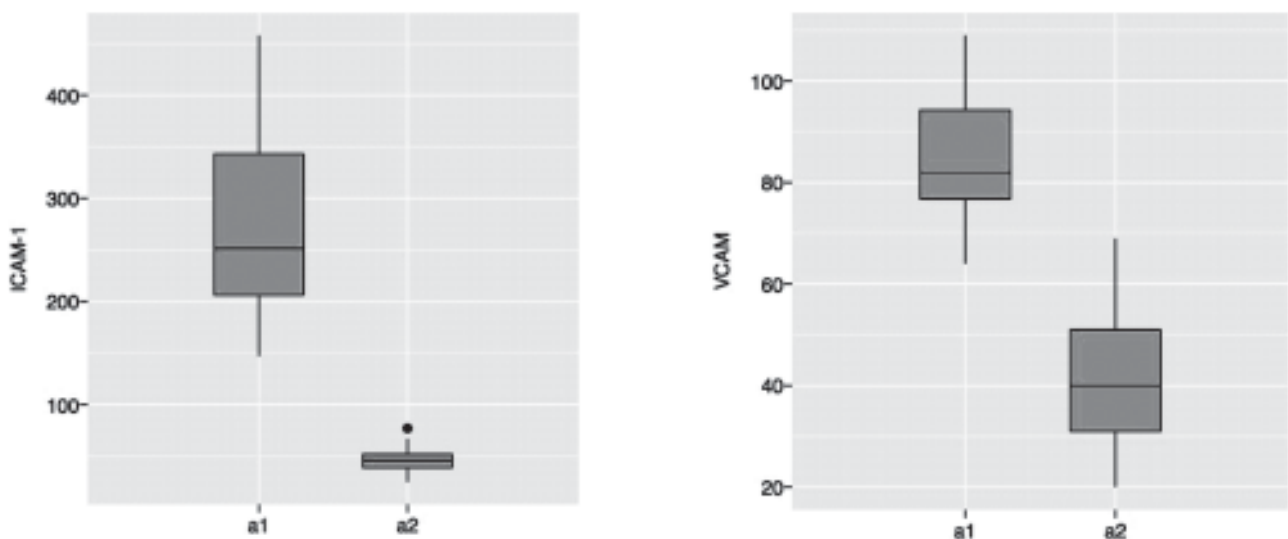


Рис. 2. Распределение пациентов с наличием и отсутствием уретральных симптомов после курса АМТ по концентрации растворимых ICAM-1 и VCAM (ng/ml) в уретральных смывах (a1 – группа ПРСТ, a2 – группа ИЗЛЧ)

В ходе нашего предыдущего исследования [15] мы обнаружили, что к персистенции симптомов уретрита может predisполагать дисбаланс цитокиновых сигналов. Одним из его проявлений была исходно «слабая» Т-хелперная (Th1)-регулируемая провоспалительная реакция на антигенные стимулы *S. trachomatis*, *U. urealyticum* или *M. genitalium*. В частности, у тех мужчин, у которых эрадикация возбудителя в результате АМТ не приводила к устранению симптомов, до её начала регистрировались более низкие концентрации ИЛ-2, ФНО, ИФН-с в уретральных смывах. Как известно, ИЛ-2, ФНО,

ИФН-с контролируют реакцию клеточной цитотоксичности, в ходе которой инфицированные эпителиальные клетки гибнут под действием ферментов (перфорина, гранулозина, гранзима, сериновых протеаз), высвобождающихся CD8+ Т лимфоцитами [16]. Также у этих мужчин в этот же период времени отмечалась более низкая продукция провоспалительного ИЛ-1в, к наиболее важным функциям которого относятся регуляция транскрипции гена ИЛ-2, дифференцировки Т и В-клеток, стимуляция хемотаксиса ПМЯЛ и макрофагов [17]. Ещё одной отличительной особенностью было ослабление

Расчётные значения критерия zT и достоверность различий между группами ИЗЛЧ и ПРСТ по концентрациям в уретральных смывах ИЛ-6, ИЛ-8, ICAM-1 и VCAM

Параметр	ИЛ-6	ИЛ-8	ICAM-1	VCAM
Критерий zT	2,2	2,3	2,6	2,5
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Примечание: $zT_{\text{критическое}} = 1,96$.

Частота выявления ключевых уретральных симптомов

Параметр	ChT, n=13, абс. (%)	UrU, n=17, абс. (%)	MyG, n=14, абс. (%)
Уретральная лейкорея	1 (7,7)	1 (5,9)	3 (21,4)
Уретральные выделения	5 (38,7)	4 (23,5)	2 (14,3)
Поллакиурия	2 (15,4)	6 (35,3)	0
Дискомфорт в уретре	9 (69,2)	11 (64,7)	10 (71,4)

противовоспалительного сигнала, что выражалось в более низкой секреции ИЛ-10, уровень которой существенно не менялся после эрадикации патогена. И наконец, персистенция уретральных симптомов была связана с более высоким содержанием в уретральных смывах ИЛ-6 и ИЛ-8 как в острую фазу воспалительного процесса, так и после элиминации антигенных структур возбудителя. Интересно, что не только ИЛ-8 является медиатором миграции иммунокомпетентных клеток. Так, для ИЛ-6 продемонстрирована способность влиять на миграцию Т-лимфоцитов, моноцитов, тучных клеток [18].

В данной работе мы исследовали возможные ассоциации между персистенцией уретральных симптомов и концентрациями растворимых молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM) в уретральных смывах, а также между уровнями этих молекул и концентрациями ИЛ-6 и ИЛ-8, обладающих хемокиновой активностью. В результате, впервые было установлено, что медианные концентрации ICAM-1, VCAM, ИЛ-6 и ИЛ-8 в уретральных смывах от мужчин с персистирующим постэрадикационным уретритом, индуцированным одним из внутриклеточных возбудителей (*S. trachomatis*, *U. urealyticum* или *M. genitalium*) достоверно превышали таковые у пациентов с микробиологическим и клиническим выздоровлением. Более того, в группе мужчин с персистенцией симптомов уретрита была выявлена прямая корреляция между концентрациями ICAM-1 и VCAM в уретральных смывах, с одной стороны, и концентрациями ИЛ-6 и ИЛ-8. Оба установленных факта указывают на то, что ИЛ-6, ИЛ-8, ICAM-1, VCAM ока-

зывают синергичные влияния, способствующие депонированию иммунокомпетентных клеток в подслизистом слое уретры. Корреляция между концентрациями адгезивных молекул и цитокинов может объясняться влиянием цитокинов на экспрессию растворимых молекул межклеточной адгезии.

На основании анализа литературных источников и результатов собственных исследований мы выдвинули гипотезу, согласно которой патогенез постэрадикационного уретрита обусловлен дисбалансом цитокиновой регуляции, проявляющимся ослабленной продукцией T_H1-специфичных провоспалительных цитокинов и противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и усилением продукции провоспалительных цитокинов с хемокиновой активностью (ИЛ-6, ИЛ-8). Среди причин указанного дисбаланса могут быть исходно низкая микробная нагрузка, особенности функционирования Толл-подобных рецепторов, адаптивных белков, транскрипционных факторов или полиморфизм генов, кодирующих конкретные цитокины. Независимо от причин указанного дисбаланса повышенная продукция ИЛ-6, ИЛ-8 ассоциируется с усилением экспрессии растворимых молекул ICAM-1 и VCAM, что в итоге усиливает хемотаксис лимфоцитов в ткань уретры.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на выяснение конкретных механизмов отдельных уретральных симптомов и способов их коррекции.

Выводы

1. Цитокины с хемокиновой активностью (ИЛ-6, ИЛ-8) и растворимые молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM) являются

ключевими факторами патогенеза персистирующего постэрадикационного уретрита, что подтверждается наличием статистически достоверных различий по медианным концентрациям этих медиаторов между пациентами с персистенцией симптомов и клиническим излечением.

2. Цитокины (ИЛ-6, ИЛ-8) и адгезивные молекулы (ICAM-1, VCAM) оказывают синер-

гичные влияния, способствующие рекрутингу и депонированию иммуннокомпетентных клеток, на что указывает наличие корреляции между концентрациями этих медиаторов.

3. Дальнейшие исследования должны быть направлены на установление механизмов развития конкретных симптомов и способов их коррекции.

Список литературы

1. Horner P.J., Blee K., Falk L. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis // *Int. J. STD AIDS*. – 2016. – V. 27, N 11. – P. 928–937.
2. Wikstrom A., Jensen J.S. *Mycoplasma genitalium: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline* // *Sex. Transm. Infect.* – 2006. – V. 82. – P. 276–279.
3. Yasumoto R., Kawano M., Senju M., Nishisaka N., Kyo M., Kishimoto T. *Urinary interleukin-6 and interleukin-8 in females with urethral syndrome* // *Hinyokika Kyo*. – 1997. – V. 43, N 4. – P. 267–270.
4. Khadra A., Fletcher P., Luzzi G., Shattock R., Hay P. *Interleukin-8 levels in seminal plasma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and nonspecific urethritis* // *BJU Int.* – 2006. – V. 97, N 5. – P. 1043–1049.
5. Pate M.S., Hedges S.R., Sibley D.A., Russell M.W., Hook E.W., Mestecky J. *Urethral cytokine and immune responses in Chlamydia trachomatis-infected males* // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69, N 11. – P. 7178–7181.
6. Huang G.T., Kim D., Lee J.K., Kuramitsu H.K., Haake S.K. *Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of Porphyromonas gingivalis via antagonistic mechanisms* // *Infect Immun.* – 2001. – V. 69, N 3. – P. 1364–1372.
7. Jarvis G.A., Li J., Swanson K.V. *Invasion of Human Mucosal Epithelial Cells by Neisseria gonorrhoeae Upregulates Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)* // *Infect Immun.* – 1999. – V. 67, N 3. – P. 1149–1156.
8. He J., You X., Zeng Y., Yu M., Zuo L., Wu Y. *Mycoplasma genitalium-Derived Lipid-Associated Membrane Proteins Activate NF- κ B through Toll-Like Receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-Dependent Pathway* // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – V. 16, N 12. – P. 1750–1757.
9. Pingnan S., Zhiyong L., Lihong Y., Yaqin F., Suhong T., Guohong X., Jincheng R., Liming M. *Effect of tripterygium wilfordii polyglycoside on experimental prostatitis caused by ureaplasma urealyticum in rats* // *Med. Sci. Monit.* – 2016. – V. 22. – P. 3722–3726.
10. Wessler S., Muenzner P., Meyer T.F., Naumann M. *The anti-inflammatory compound curcumin inhibits Neisseria gonorrhoeae-induced NF-kappaB signaling, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and attenuates adhesion in late infection* // *Biol. Chem.* – 2005. – V. 386, N 5. – P. 481–490.
11. Chandrasekar B., Melby P.C., Sarau H.M., Raveendran M., Perla R.P., Marelli-Berg F.M., Dulin N.O., Singh I.S.. *Chemokine-cytokine cross-talk. The ELR+ CXC chemokine LIX (CXCL5) amplifies a proinflammatory cytokine response via a phosphatidylinositol 3-kinase-NF-kappa B pathway* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, N 7. – P. 4675–4686.
12. Анфілова М.Р. Динаміка інтенсивності лейкої, сироваткових концентрації адгезинів ICAM-1 та VCAM-1 під впливом антимікробної терапії у чоловіків з первинним та рецидивним монобактеріальним гострим уретритом, спричиненим *S. trachomatis*, *M. genitalium* та *U. urealyticum* // *Дерматовенерологія. Косметологія. Сексопатологія*. – 2015. – № 3–4. – С. 46–53.
13. Taylor-Robinson D., Purcell R.H., London W.T., Sly D.L., Thomas B.J., Evans R.T. *Microbiological, serological, and histopathological features of experimental Chlamydia trachomatis urethritis in chimpanzees* // *Br. J. Vener. Dis.* – 1957. – V. 1. – P. 36–40.
14. McGowin C.L., Annan R.S., Quayle A.J., Greene S.J., Ma L., Mancuso M.M., Adegboye D., Martin D.H. *Persistent Mycoplasma genitalium infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion* // *Infect. Immun.* – 2012. – V. 80, N 11. – P. 3842–3851.
15. Анфілова М.Р. Роль цитокинового дисбаланса в персистенції уретральних симптомів у чоловіків, прошедших стандартну антимікробну терапію по поводу негонококкового уретрита,

вызванного *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium* // *Дерматовенерология. Косметология.* – 2017. – Т. 3, № 2.

16. C. Wang, J. Tang, P.A Crowley-Nowick, C. M. Wilson, R. A. Kaslow, W.M Geisler. Interleukin (IL)-2 and IL-12 responses to *Chlamydia trachomatis* infection in adolescents // *Clin. Exp. Immunol.* – 2005. – V. 142, N 3. – P. 548–554.

17. Wang C., Tang J., Geisler W.M., Crowley-Nowick P.A., Wilson C.M., Kaslow RA. Human leukocyte antigen and cytokine gene variants as predictors of recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk adolescents // *J. Infect. Dis.* – 2005. – V. 191. – P. 1084–1092.

18. Clahsen T., Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2008. – V. 84, N 6. – P. 1521–1529.

Реферат

РОЛЬ АДГЕЗИНОВОЇ ТА ЦИТОКІНОВОЇ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У ПАТОГЕНЕЗІ ПЕРСИСТУЮЧОГО ПОСТЕРАДИКАЦІЙНОГО УРЕТРИТУ У ЧОЛОВІКІВ, ІНДУКОВАНОГО *C. TRACHOMATIS*, *U. UREALYTICUM*, *M. GENITALIUM*

М.Р. Анфілова

Метою дослідження було вивчити роль розчинних молекул міжклітинної адгезії (ICAM-1, VCAM) у патогенезі персистуючого негонококового уретриту у чоловіків, індукованого *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium* і визначити їх можливий зв'язок з вмістом в уретральних змивах цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-8).

Висновки: Цитокіни з хемокіновою активністю (ІЛ-6, ІЛ-8) та розчинні молекули міжклітинної адгезії (ICAM-1, VCAM) є ключовими факторами патогенезу персистуючого постерадикаційного уретриту, що підтверджується наявністю статистично достовірних відмінностей за медіанним вмісту цих медіаторів між пацієнтами з персистенцією симптомів і клінічним одужанням. Цитокіни (ІЛ-6, ІЛ-8) та адгезивні молекули (ICAM-1, VCAM) мають синергічний вплив, сприяючи рекрутингу та депонуванню імунокомпетентних клітин, на що вказує наявність кореляції між концентраціями цих медіаторів. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на встановлення механізмів розвитку конкретних симптомів і способів їх корекції.

Ключові слова: гострий негонококовий уретрит, імунна відповідь, персистенція, уретральний епітелій, цитокіни, молекули міжклітинної адгезії, *C. Trachomatis*, *U. Urealyticum*, *M. Genitalium*.

Адреса для листування

М.Р. Анфілова

E-mail: m_anfilova@ukr.net

Summary

THE ROLE OF ADHESIVE AND CYTOKINE SIGNALING SYSTEMS IN THE PATHOGENESIS OF PERSISTENT POST-ERADICATION URETHRITIS IN MEN, INDUCED BY *C. TRACHOMATIS*, *U. UREALYTICUM*, *M. GENITALIUM*

M.R. Anfilova

The purpose of the study was to investigate the role of soluble intercellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM) in the pathogenesis of persistent non-gonococcal urethritis in men induced by *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium* and to determine their possible association with the content of cytokines in urethral cytokines (IL -6, IL-8).

Conclusions: Cytokines with chemokine activity (IL-6, IL-8) and soluble intercellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM) are key factors in the pathogenesis of persistent post-eradication urethritis, which is confirmed by statistically significant differences in the median concentrations of these mediators between patients with persistence Symptoms and clinical cure. Cytokines (IL-6, IL-8) and adhesive molecules (ICAM-1, VCAM) have synergistic effects that promote the recruitment and deposition of immunocompetent cells, as indicated by the presence of a correlation between the concentrations of these mediators. Further studies should be aimed at establishing mechanisms for the development of specific symptoms and ways to correct them.

Keywords: acute non-gonococcal urethritis, immune response, persistence, urethral epithelium, cytokines, intercellular adhesion molecules, *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium*.