



УДК 618.2-06:616.9:612.017

## РОЛЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ БЕТА-ДЕФЕНЗИНОВ И СЕКРЕТОРНОГО ИНГИБИТОРА ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ПРОТЕАЗ В ФОРМИРОВАНИИ МИКРОБИОЦЕНОЗА ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА НА ПОЗДНИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

**О.П. ЛЕБЕДЕВА<sup>1</sup>**  
**О.Н. ИВАШОВА<sup>1</sup>**  
**С.П. ПАХОМОВ<sup>1</sup>**  
**М.И. ЧУРНОСОВ<sup>1</sup>**  
**П.В. КАЛУЦКИЙ<sup>2</sup>**  
**Г.А. ТАФИНЦЕВА<sup>3</sup>**  
**С.Л. ТУБОЛЬЦЕВА<sup>3</sup>**

<sup>1)</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет

<sup>2)</sup> Курский государственный медицинский университет

<sup>3)</sup> Белгородская областная клиническая больница Святого Иоасафа

e-mail: safonova2@yandex.ru

Человеческие бета-дефензины (human beta-defensins, HBD) относятся к классу антимикробных пептидов и представляют собой белки, которые секретируются эпителиальными клетками и лейкоцитами, обладают противовирусным, антибактериальным, фунгицидным действием. SLPI подавляет действие целого ряда протеаз, а также обладает антимикробным действием. Они являются первичным звеном защиты слизистых от патогенов в системе врожденного иммунитета.

Исследование посвящено изучению взаимосвязи концентрации HBD и SLPI с количеством условно-патогенных микроорганизмов в цервикальной слизи женского репродуктивного тракта на поздних сроках беременности. Бактериологическое исследование аэробных и анаэробных микроорганизмов проводили согласно рекомендациям Б.А. Ефимова с соавт. (2002). Экспрессию мРНК HBD и SLPI определяли методом количественной ПЦР. Для корреляционного анализа использовали критерий Спирмена. Установлено, что количество лактобацилл и кишечной палочки имеет положительную корреляционную связь с количеством бета-дефензинов. Экспрессия мРНК SLPI имела положительную корреляционную связь с количеством золотистого стафилококка.

Ключевые слова: бета-дефензины, секреторный ингибитор лейкоцитарных протеаз, антимикробные пептиды, беременность, репродуктивный тракт, лактобациллы, золотистый стафилококк, кишечная палочка.

**Введение.** Антимикробные пептиды (АМП) являются одной из первых линий защиты от проникновения бактерий, грибов и вирусов [1, 2]. Одним из механизмов их антибактериального действия является катионное связывание с отрицательно заряженной мембраной микроорганизмов, что приводит к ее разрыву или перфорации и как следствие – к гибели клетки [3]. АМП также осуществляют хемотаксис незрелых дендритных клеток, N-хелперов, моноцитов, макрофагов, активируют нейтрофилы, те самым являясь связующим звеном между системами врожденного и приобретенного иммунитета [4]. Человеческие бета – дефензины (human beta-defensins, HBD) относятся к классу антимикробных пептидов и представляют собой белки, которые секретируются эпителиальными клетками и лейкоцитами и обладают противовирусным, антибактериальным, фунгицидным действием. Важную роль в защите женских половых путей имеет также выработка антипротеаз. Также известно, что выраженное воспаление приводит к разрушению тканей, в значительной степени из-за действия протеаз, выделяемых иммунокомпетентными клетками. Защита тканей хозяина от повреждений, вызванных чрезмерным иммунным ответом, осуществляется с помощью антипротеаз, в том числе: секреторного ингибитора лейкоцитарных протеаз (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI). SLPI подавляет действие целого ряда протеаз, включая эластазу, трипсин и катепсин G, а также обладает антимикробным действием [5].

**Материалы и методы.** Было обследовано 85 женщин на сроке беременности 38-41 неделя. Материалом для определения экспрессии мРНК HBD и SLPI служили клетки эпителия цервикального канала.

Бактериоскопическое и бактериологическое исследование проводилось в бактериологической лаборатории Белгородской ОКБ Святого Иоасафа. Бактериоскопическое исследование содержимого влагалища и цервикального канала проводили после окрашивания мазков по Граму. Для верификации видов аэробных и анаэробных микроорганизмов был использован бактериологический метод исследования в соответствии с методикой действующего Приказа МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 [6] и методическими рекомендациями Б.А. Ефимова с соавт. (2002) [7]. Подсчет колониеобразующих единиц производили по методу Коха (А.И. Заикина, 1984) [8]. Аэробные микроорганизмы культивировали в суховоздушном термостате ТВ-80-1



(«Касимовский завод», Россия). Исследование анаэробных микроорганизмов проводили в бескислородных условиях в термостате – анаэростате MCO-15AC («Sanyo», Япония).

Посев аэробных микроорганизмов первоначально производили на 5% кровяной агар с последующим отсевом на селективные среды. Для выделения энтерококков использовали селективный Bile esculin azid agar («Sigma-Aldrich», США), позволяющий дифференцировать их от других стрептококков на основании его способности расти в присутствии желчи. Для выделения стафилококков применяли желточно-солевой агар Staphylococcus agar («Conda», Испания). Дифференциальную диагностику между эпидермальным и золотистым стафилококком проводили на основании способности последнего к плазмокоагуляции. Для обнаружения кишечной палочки производили посев на среду Эндо (ЗАО «НИЦФ», Россия). Культивирование энтеробактерий, клебсиеллы, протей, синегнойной палочки проводили на среде MacConkey («Conda», Испания) с последующей микроскопической идентификацией и верификацией на основании определения оксидазной, каталазной, лецитиназной активности.

Лактобактерии культивировали на среде MRS (ЗАО «НИЦФ», Россия), на которой они росли в виде белых гладких или шероховатых колоний и не обладали оксидазой и каталазой активностью. Бифидобактерии высевались на твердой среде Блаурокка («Conda», Испания) в течение 72 часов. Они имели типичный вид «куриной косточки» при бактериоскопическом исследовании колоний. Для обнаружения грамположительных спорообразующих клостридий посевы проводили на среду Columbia agare base («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 5% крови и 24-х часовой анаэробной инкубацией. Бактероиды высевали на селективной среде Bacteroides Bile esculin agar («Sigma-Aldrich», США). Для выделения других облигатно- и факультативно анаэробных бактерий использовали Schaedler agar («Sigma-Aldrich», США) и жидкую тиогликолевую среду Fluid Thioglycollate medium («Becton-Dickinson», США). Грибы рода Candida высевались на среде Сабуро (ЗАО «НИЦФ», Россия) в течение 72 часов.

Определение экспрессии мРНК HBD и SLPI проводили методом количественной ПЦР в НИЛ «Молекулярная генетика человека» НИУ БелГУ.

Сбор материала проводили с помощью цитощетки. Полученные эпителиальные клетки помещали в консервирующий раствор RNAlater («Ambion», США). Выделение РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции, описанным производителем, с использованием реагента Тризол («Invitrogen», США). Качество РНК проверяли методом электрофореза в течение 15 минут при напряжении 10V/см по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК в 1,1 % агарозном геле с бромистым этидием. Затем образцы обрабатывали ДНКазой DNase I RNase free («Fermentas», США) для удаления геномной ДНК согласно инструкции производителя. Для проведения обратной транскрипции использовали набор «Обратная транскриптаза Mint» («Евроген», Россия). Для инициации реакции применяли олигодезоксинуклеотиды (oligoDT), синтезированные фирмой «Евроген». Реакцию обратной транскрипции проводили согласно инструкции производителя на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). В реакцию вносили 500 нг. РНК, предварительно прогретой до 55 градусов (концентрацию РНК проверяли на спектрофотометре «Nanodrop» («Thermoscientific», США) (20 мкМ). Качество полученной кДНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 1,1 % агарозном геле с бромистым этидием. Для количественной ПЦР использовали разведение полученной кДНК со стерильной водой в объеме 1:25. Исследование экспрессии мРНК HBD и SLPI проводили с помощью количественной обратно-транскриптазной ПЦР согласно рекомендациям MIQE [9]. Подбор праймеров генов осуществлялся с помощью базы данных BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Была изучена экспрессия мРНК антимикробных пептидов, последовательности нуклеиновых кислот которых доступны в базе данных BLAST: секреторного ингибитора лейкоцитарных протеаз (SLPI), человеческого β-дефензинов (HBD1, HBD3 и HBD4). Полученные пары праймеров были протестированы на возможность образования «шпилек» и димеров с помощью программы Beacon Designer Free Edition (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>).

Для ПЦР в режиме реального времени использовали смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). С помощью программы GeNorm-Plus ([www.biogazelle.com](http://www.biogazelle.com)) в качестве генов-нормировщиков были выбраны наиболее стабильно экспрессируемые – бета-актин и пептидилпролилизомераза А (PPIA). Амплификацию проводили в амплификаторе «CFX96» («BioRad», США). Для приготовления смеси на одну пробирку вносили 2 мкл кДНК, по 2 мкл прямого и обратного праймера, 5 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR, 14 мкл стерильной воды. Амплификацию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация – 1 цикл 95°C 5 мин, денатурация – 1 цикл 95°C 30 сек; отжиг при соответствующей каждому праймеру температуре (табл. 1) – 30 сек; элонгация при 68 °C – 30 сек. Количество циклов – 45. Дополнительным этапом после амплификации была добавлена кривая плавления от 55 до 95 градусов по 6 секунд с целью детекции возможных димеров праймеров.



Таблица 1

### Праймеры для количественной ПЦР

Ген	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Темпера- тура от- жига, °С
SLPI	GCAGTGTCCAGGGAAGAAGA	TGGGTTTGGGGTGTCAACAG	64,5
HBD1	TGTCTGAGATGGCCTCAGGT	TCGGGCAGGCAGAATAGAGA	63,5
HBD3	CTGCCTTACCATTGGGTTCCT	TGCCGATCTGTTCCTCCTTT	55,5
HBD4	CTTGTGCTGCTATTAGCCGTT	GGGCAGTCCCATAACCACAT	59
β-actin	CAGGCACCAGGGCGTGATGG	GATGGAGGGGCCGACTCGT	64
PPIA	CCGCCGAGGAAAACCGTGTACT	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT	64

Полученные результаты выражали в относительных единицах, вычисляя их по формуле:

$$R = 2^{-((Cq \text{ target} - (Cq \text{ ref1} + Cq \text{ ref2})/2))}$$

где R — нормализованная экспрессия мРНК исследованных генов, Cq target — Cq (quantification cycle, «пороговый» цикл) исследованного гена, Cq ref1 и Cq ref2 — Cq генов-нормировщиков [10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica 6.0» лицензия № AXXR505C705306FAN12 (Statsoft, США). Проверка нормальности распределения признаков проводилась с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Так как результаты не подчинялись нормальному распределению, корреляционный анализ проводили с помощью критерия Спирмена. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Было установлено, что между представителями нормальной и условно-патогенной микрофлоры женских половых путей и синтезом HBD и SLPI наблюдается как положительная корреляционная связь.

Так, сильная положительная корреляционная связь наблюдалась между количеством лактобацилл и HBD4 ( $R=0,76$ ,  $p < 0,05$ ). (табл. 2).

Таблица 2

### Корреляция между АМП и бактериальной обсемененностью в цервикальном канале на поздних сроках беременности, критерий Спирмена (n=85)

№	Бактерии (КОЕ/мл) / антимикробные пептиды (отн.ед.)	SLPI	HBD1	HBD3	HBD4
1	Staphylococcus aureus	<b>0,83*</b>	0,10	0,43	0,11
2	Staphylococcus epidermidis	0,06		0,06	0,14
3	Enterococcus spp.	-0,01	-0,57	-0,25	0,05
4	Acinetobacter spp.	0,02	0,12	-0,15	-0,07
5	Escherichia coli	0,15	<b>0,62*</b>	0,02	0,10
6	Corynebacterium spp.	0,11	0,31	-0,09	0,02
7	Klebsiella spp.	0,65	0,21	0,11	0,04
8	Proteus vulgaris	-0,18	0,13	-0,12	0,13
9	Clostridium spp.	-0,05	0,09	-0,55	-0,22
10	Peptostreptococcus spp.	0,24	0,18	0,07	0,31
11	Bacteroides spp.	-0,19	0,11	0,06	-0,27
12	Candida albicans	-0,15	0,12	-0,11	0,12
13	Lactobacillus spp.	0,06	-0,13	0,12	<b>0,76*</b>
14	Enterobacter spp.	-0,14	0,13	0,45	0,21

Примечание: \* –  $p < 0,05$

Это косвенно подтверждает результаты исследований E. Valore et al. (2006), которые установили, что при уменьшении содержания лактобацилл при бактериальном вагинозе анти-



микробная активность влагалищного секрета, наблюдается уменьшение концентраций HBD1 и HBD2, а также HNP 1-4 по сравнению со здоровыми женщинами и пациентками с вульвовагинальным кандидозом. Это коррелирует с низким числом нейтрофилов и уровнем интерлейкина-8. Однако уровень дефензинов быстро приходит в норму после лечения бактериального вагиноза. Снижение уровня антимикробных пептидов при данном виде дисбиоза объясняется слабой способностью *Gardnerella vaginalis* индуцировать иммунный ответ. Это связано с тем, что гарднереллы, в отличие от лактобацилл, не активируют синтез HBD2, интерлейкина-1 и интерлейкина-8 клетками эпителия влагалища из-за отсутствия на их поверхности липополисахаридов и низкой концентрации пептидогликана. Поэтому не происходит активации Толл-подобных рецепторов 1, 2 и 4, и, как следствие, снижается выработка дефензинов [11].

Кроме того, положительная сильная корреляционная связь была выявлена между количеством *Escherichia coli* и экспрессией HBD1 ( $R=0,62$ ,  $p<0,05$ ). В исследовании M. Schlee et al. (2007) было показано, что пробиотический штамм кишечной палочки способен активировать синтез  $\beta$ -дефензина HBD2 за счет присутствия в его клеточной стенке флагеллина, что может объяснить наличие положительной корреляционной связи между этим микроорганизмом и синтезом  $\beta$ -дефензинов [12].

Сильная положительная корреляционная связь наблюдалась между экспрессией SLPI и количеством *Staphylococcus aureus* ( $R=0,83$ ,  $p<0,05$ ). Это согласуется с данными других исследований. Так, в экспериментальной модели травмы роговицы глаза синтез мРНК SLPI и его белка были значительно выше в присутствии *Staphylococcus aureus* по сравнению с их синтезом при неинфицированном повреждении [13].

**Выводы.** Таким образом, HBD и SLPI играют важную роль в регуляции микробиоценоза влагалища. Требуются дальнейшие исследования для оценки возможностей использования АМП в качестве средств профилактики и лечения воспалительных заболеваний женских половых путей.

**Исследование выполнено при поддержке государственного задания № 572.**

#### Литература

1. Будихина, А. С. А-дефензины – антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции/ А. С. Будихина, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2008. – № 5. – С. 317-320.
2. Ивашова, О. Н. Антимикробные пептиды в защите от инфекционных осложнений в акушерстве и гинекологии (обзор) / О. Н. Ивашова, О. П. Лебедева, С. П. Пахомов. и др. // Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – № 5. – С. 81-89.
3. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity/ M. Doss [et al.] // J Leukoc Biol. – 2010. – № 87. – С. 79-92.
4. Niyonsaba, F. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils/ F. Niyonsaba, H. Ogawa, I. Nagaoka // Immunology. – 2004. – № 111. – С. 273-281.
5. Rorh, J. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2/ J. Rorh, D. Yang, R. I. Lehrer // J. Immunol. – 2010. – № 184. – С. 6688-6694.
6. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ Минздрава СССР от 22 апр. 1985 г. № 535 [Электронный ресурс] / КонсультантПлюс: Документы СССР: справочная правовая система.
7. Ефимов, Б. А. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища / Б. А. Ефимов, Л. И. Кафарская, В. М. Коршунов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. – № 4. – С. 72-78.
8. Заикина, А. И. Лабораторный практикум по общей микробиологии / А. И. Заикина // Москва: РХТУ, 1984. – 40 с.
9. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments/ S. A. Bustin [et al.] // Clinical Chemistry. – 2009. – № 55. – Vol. 4. – С. 611-622.
10. Pfaffl, M. V. Relative quantification in book: Real Time PCR / M. V. Pfaffl. // Int. University Line. – 2002. – P. 63-82.
11. Valore, E.V. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis / E. V Valore, D. J. Wiley, T. Ganz. // Infect Immun. – 2006. – № 74(10). – С. 5693-702.
12. / Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T.A., Stange E.F., Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin / M.Schlee [et al.] // Infect. Immun. – 2007. – № 75. – С. 2399-407.
13. Secretory leukoprotease inhibitor: a native antimicrobial protein in the innate immune response in a rat model of *s. aureus* keratitis / V.E. Reviglio [et al.] // J Ophthalmol. – 2009. – 2009: 259393. doi: 10.1155/2009/259393. Epub 2009 Oct 15.



## **HUMAN BETA-DEFENSINS AND SECRETORY LEUCOCYTE PROTEASE INHIBITOR IN FORMING OF MICROBIOCENOSIS OF FEMALE REPRODUCTIVE TRACT AT LATE PREGNANCY**

**O.P. LEBEDEVA<sup>1</sup>**  
**O.N. IVASHOVA<sup>1</sup>**  
**S.P. PAKHOMOV<sup>1</sup>**  
**M.I. CHURNOSOV<sup>1</sup>**  
**P.V. KALUTSKY<sup>2</sup>**  
**G.A. TAFINTSEVA<sup>3</sup>**

*<sup>1)</sup>Belgorod National  
Research University*

*<sup>2)</sup>Kursk State Medical University*

*<sup>3)</sup>Belgorod regional clinical  
hospital of St. Ioasaf*

*e-mail: safonova2@yandex.ru*

Human beta-defensins (HBD) are proteins, secreted by epithelial cells and leucocytes, having antiviral, antibacterial, fungicidal action. SLPI is active against proteases and also has antimicrobial effect. AMPs provide the primary defense in the innate immune system against pathogens.

Study investigates the relationship between HBDS and SLPI and concentration of normal and opportunistic bacteria in the cervical mucus of the female reproductive tract in late pregnancy. Bacteriological examination of aerobic and anaerobic microorganisms was performed as recommended by B.A. Efimov et al. (2002). HBDS and SLPI mRNA expression was determined using quantitative PCR. For correlation analysis Spearman criteria was used. It was found, that the number of lactobacilli and Escherichia coli has a positive correlation with amount of beta – defensins. mRNA expression of SLPI has positive correlation with amount of Staphylococcus aureus.

Key words: human beta-defensins, secretory leucocyte protease inhibitor, antimicrobial peptides, pregnancy, reproductive tract, Lactobacillus, Staphylococcus, Escherichia coli.