

Г. І. Михайлишин

## ВПЛИВ БАКТЕРІЙНОГО ВАГІНОЗУ НА РОЗВИТОК ПОРУШЕНЬ КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ У ЖІНОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Імунна реакція на бактерійний вагіноз залишається недостатньо вивченою. Мікробіота вагіни може впливати на функцію імунної системи організму. Здатність мікроорганізмів модулювати локальну та системну імунну відповідь, вимагає складного діалогу між вродженими та адаптивними компонентами імунної системи. Оскільки імунна система слизової оболонки є досить унікальною порівняно з іншими поверхнями слизової оболонки, вона може адаптуватися до менструального циклу у відповідь на гормональні стимули.

**Мета дослідження** – дослідити вплив бактерійного вагінозу на показники клітинної ланки імунітету жінок репродуктивного віку.

**Матеріали і методи.** Обстежено 115 жінок репродуктивного віку з порушенням мікробіоти вагіни. Після вивчення видового складу мікробіоти вагіни було сформовано відповідні групи обстежень: перша група контролю (з нормоценозом вагіни,  $n=30$ ), друга група (проміжний тип мікробіоти,  $n=20$ ) і третя група (бактерійний вагіноз  $n=65$ ).

Для лікування бактерійного вагінозу у жінок третьої групи згідно з протоколом лікування “Аномальних вульвовагінальних виділень” ми обрали метронідазол. У другій групі з проміжним типом мікробіоти вагіни для нормалізації видового складу та пацієнткам третьої групи з бактерійним вагінозом для відновлення мікробіоти вагіни використовували пробіотик з вмістом штаму живих *Lactobacillus casei* IMB B-7280 у вигляді капсул та супозиторіїв 1 раз на день.

Після застосування комплексної терапії для відновлення мікробіоти вагіни в досліджуваних групах вивчали показники клітинної ланки імунітету до лікування та через 1 місяць після лікування.

**Результати досліджень та їх обговорення.** При вивченні клітинної ланки імунітету у досліджуваних групах пацієнток репродуктивного віку з порушеннями мікробіоти вагіни до лікування не було виявлено статистично достовірних змін рівнів імунорегуляторного індексу ( $CD4+$ ,  $CD8-/CD4-$ ,  $CD8+$ ), цитотоксичних клі-

тин ( $CD3+$ ,  $CD56+$ ), NK-клітин ( $CD3-$ ,  $CD56+$ ), В-лімфоцитів ( $CD3-$ ,  $CD19+$ ), моноцитів ( $CD14$ ) і вони були у межах референтних норм. Проте після лікування було досліджено статистично значущі різниці NK-клітин ( $CD3-$ ,  $CD56+$ ) та моноцитів ( $CD14$ ) залежно від груп дослідження. Шляхом встановлення кореляції між В-лімфоцитами ( $CD3-$ ,  $CD19+$ ) і NK-клітинами ( $CD3$ ,  $CD56+$ ) було оцінено помірний від’ємний зв’язок. Після застосування пробіотикотерапії спостерігалась тенденція до підвищення рівня NK-клітин ( $CD3-$ ,  $CD56+$ ) та моноцитів ( $CD14$ ) у досліджуваних групах.

**Висновок.** При аналізі досліджуваних показників клітинної ланки імунітету у пацієнток з порушенням мікробіоти вагіни було встановлено статистично достовірні зміни NK-клітин ( $CD3-$ ,  $CD56+$ ) ( $p=0,025$ ) та моноцитів ( $CD14$ ) ( $p=0,014$ ) після лікування залежно від досліджуваної групи.

**Ключові слова:** бактерійний вагіноз, вагінальна мікробіота, пробіотик, лактобактерії, репродуктивний вік, Т-клітини, В-клітини, антибіотик.

Домінування лактобактерій у мікробіоті вагіни забезпечує вироблення молочної кислоти, перекису водню, підтримує рН та забезпечує захист від інфекцій. Будь-які зміни у складі вагінального мікробіому можуть призвести до бактерійного вагінозу (БВ), який часто пов’язаний із запаленням піхви та підвищує ризик зараження інфекціями, що передаються статевим шляхом (ІПСШ), наприклад вірусом імунодефіциту людини і негативно впливає на репродуктивне здоров’я жінок [1-6].

Близько 50 % епізодів порушення мікробіоти піхви перебігає без клінічних проявів, хоча вплив безсимптомних форм захворювання на репродуктивне здоров’я є досить значним, і часто некоригованим [7, 8].

Вагінальне запалення є ще однією суперечливою ознакою БВ. Деякі дослідження показали, що не було статистично значущої різниці між будь-якими середніми концентраціями прозапальних цитокінів (IL-6, IL-10, IL-12), у жінок з БВ. Високі рівні пролідази та сіалідази

призвели до розщеплення вагінального імуноглобуліну А (IgA) та IgM. Навпаки, інші дослідження надали докази того, що вагінальне запалення цілком може бути при БВ і що специфічні БВ-асоційовані бактерії, крім *Gardnerella spp.* та *Prevotella spp.* можуть викликати прозапальні реакції. Епітеліальні та імунні клітини під час «здорового стану» сприяють гомеостазу, виробляючи протизапальні цитокіни у відповідь на низькі рівні цитокінів, що виробляються епітеліальними клітинами, тоді як під час ранньої колонізації *Gardnerella spp.* і *Prevotella bivia*, сіалідаза виробляється, щоб викликати порушення слизового бар'єру та дозволити уникнути імунної відповіді [9].

Мікробіота вагіни містить значну кількість імунних клітин, таких як природні кілери (NK), В-клітини та Т-клітини, макрофаги/дендритні клітини, нейтрофіли та опасисті клітини. Кількість і фенотип цих клітин змінюються протягом менструального циклу. В останні роки стало очевидним, що мікробіота може впливати на фенотип і функцію імунних клітин [10-12]. Різноманітні підходи до лікування БВ постійно розглядаються клініцистами в усьому світі, включаючи використання антибіотиків, пробіотиків або бактеріофагів. Антибіотиками вибору, що використовуються для лікування БВ, є пероральний або інтравагінальний метронідазол та кліндаміцин. Однак повідомлялося, що частота рецидивів становить 76 % протягом шести місяців після лікування, що, ймовірно, пов'язано зі стійкістю патогенних бактерій до антибіотиків та їхніми біоплівками [2, 3, 5, 13].

Мета роботи – дослідити вплив бактерійного вагінозу на показники клітинної ланки імунітету у жінок репродуктивного віку.

### Матеріали і методи

Обстежено 115 пацієнок з порушеннями мікробіоти вагіни. Дослідження здійснювали на базі Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України. Після вивчення видового складу мікробіоти вагіни було сформовано відповідні групи обстежень: перша група контролю (з нормоценозом вагіни, n=30), друга група (проміжний тип мікробіоти, n=20) і третя група (бактерійний вагіноз n=65). Для дослідження було застосовано комбіноване лікування у досліджуваних групах пацієнок. Антибактерійна терапія призначалась для лікування жінок з БВ. Препаратом вибору для лікування БВ згідно з протоколом лікування «Аномальних вульвовагінальних виділень» ми обрали метронідазол. Крім цього, застосовували пробіотик «Діалак» з вмістом штаму живих *Lactobacillus casei* IMB B-7280 у вигляді капсул і супозиторіїв для відновлення мікробіоти вагіни в двох основних досліджуваних групах.

Показники клітинної ланки імунітету вивчали методом проточної цитофлуориметрії до лікування та через 1 міс. після лікування.

Кількісні показники оцінювали на нормальність за допомогою тесту Шапіро-Уїлка (коли кількість об'єктів була менше 50) або тесту Колмогорова-Смірнова (коли кількість об'єктів була більше 50). Кількісні показники, що мають нормальний розподіл, описувалися за допомогою середнього значення (M) та стандартного відхилення (SD), де також оцінювали довірчий інтервал на рівні 95 % (95 % CI) для середнього. Кількісні показники, що мали ненормальний розподіл, описувалися за допомогою медіани (Me) та нижнього та верхнього квартилей (Q1–Q3). Категоріальні дані описувалися за допомогою абсолютних і відносних частот. Для порівняння двох груп за кількісним показником, розподіл якого відрізнявся від нормального, використовувався U-тест Манна-Уїтні. Порівняння трьох або більше груп за кількісним показником, який має нормальний розподіл, виконувалося за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, а як post-hoc метод використовувався тест Тьюкі (з умовою рівних дисперсій).

Порівняння трьох або більше груп за кількісним показником, розподіл якого відрізнявся від нормального, виконувалося за допомогою тесту Крускала-Уолліса, а як post-hoc метод використовувався критерій Данна з корекцією за методом Холма.

Порівняння двох груп за кількісним показником, який має нормальний розподіл, при умові рівності дисперсій виконувалося за допомогою t-тесту Стьюдента.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою персонального комп'ютера «Microsoft Excel 2016» (Microsoft) та комп'ютерних програм для статистичного аналізу та оброблення даних «STATISTICA® 8.0» (StatSoft Inc., США) та IBM® SPSS® Statistics Version 16.0.

### Результати досліджень та їх обговорення

Було вивчено клітинну ланку імунітету пацієнок з порушеннями мікробіоти вагіни репродуктивного віку до та після лікування. Рівні імунорегуляторного індексу (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+), цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+), NK-клітин (CD3-, CD56+), В-лімфоцитів (CD3-, CD19+), моноцитів (CD14) були у межах референтних норм, що свідчить про збереження компенсаторних механізмів організму жінки репродуктивного віку при нетривалому перебігу досліджуваних захворювань (табл. 1).

Був здійснений аналіз показників імунорегуляторного індексу (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+) з урахуванням групи. При порівнянні CD4+, CD8-/CD4-, CD8+ залежно від групи статистично значущої різниці не виявлено (до лікування p=0,102, та p=0,211 після лікування, застосований тест Крускала-Уолліса). Проте у групі жінок з нормоценозом спостерігалась тенденція до підвищення показника порівняно з і значенням до лікування (табл. 2).

Таблиця 1

Описова статистика кількісних показників клітинної ланки імунітету в усіх обстежуваних пацієнток до лікування

Змінна	M±SD/Me	95 % CI/Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	n	min	max
Імунорегуляторний індекс (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+), Me	2	1-2	115	1	4
Цитотоксичні клітини (CD3+, CD56+), Me	6	4-8	115	2	25
NK-клітини (CD3-, CD56+), Me	11	7-15	115	2	34
В-лімфоцити (CD3-, CD19+), Me	9	7-11	115	4	16
Моноцити (CD14), Me	8	7-9	115	5	11
GLA (CD45), Me	99	99-100	115	9	100

Під час порівняння рівня цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+) до та після лікування залежно від групи статистично значущої різниці не виявлено (p=0,198) Вони залишались такими ж, як і до лікування (p=0,266, застосований тест Крускала-Уолліса, табл. 1, 2).

Таблиця 2

Описова статистика кількісних змін Т-клітинної ланки після лікування в усіх пацієнток

Змінна	M±SD/Me	95 % CI/Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	n	min	max
Імунорегуляторний індекс (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+), Me	2	1-2	115	1	4
Цитотоксичні клітини (CD3+, CD56+), Me	6	4-7	115	2	21
NK-клітини (CD3-, CD56+), Me	12	7-15	115	3	30
В-лімфоцити (CD3-, CD19+), Me	9	7-11	115	4	18
Моноцити (CD14), Me	7	7-8	115	5	12

Були виявлені статистично значущі відмінності показників після лікування при порівнянні NK-клітин (CD3-, CD56+) залежно від групи дослідження (p=0,025) (застосований тест Крускала-Уолліса, табл. 3). Проте у групі жінок з проміжним типом цей показник залишався підвищеним після лікування порівняно з першою та третьою обстежуваними групами, що потребує розробки додаткових методів корекції.

Таблиця 3

Аналіз NK-клітин (CD3-, CD56+) з урахуванням групи після лікування

Змінна	Категорії	NK-клітини (CD3-, CD56+)			p
		Me	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	n	
Група	контроль	11	7 – 13	30	0,025* p <sub>проміжний тип мікробіоти-контроль</sub> = 0,026 p <sub>бактерійний вагіноз-проміжний тип мікробіоти</sub> = 0,046
	проміжний тип мікробіоти	14	11 – 17	20	
	бактерійний вагіноз	11	7 – 15	65	

Стан показників В-лімфоцитів (CD3-, CD19+) до та після лікування залежно від групи статистично значущої різниці не має (p=0,851) (застосований однофакторний дисперсійний аналіз).

Порівнюючи показники моноцитів (CD14) залежно від досліджуваних груп до лікування, статистично значущої різниці не виявлено (p=0,662). Після лікування встановили статистично значущу відмінність залежно від групи дослідження (p=0,014) (застосований тест Крускала-Уолліса). Цей показник у другій та третій групах

мав тенденцію до зменшення порівняно з показниками першої групи (табл. 4).

Також проаналізували кореляцію між В-лімфоцитами (CD3-, CD19+) і NK-клітинами (CD3-, CD56+, мал. 1). Було оцінено помірну від'ємну кореляцію між NK-клітинами (CD3-, CD56+) і В-лімфоцитами (CD3-, CD19+, що свідчить про взаємовплив рівнів В-лімфоцитів (CD3-, CD19+) і NK-клітин (CD3-, CD56+) у досліджуваній когорті пацієнток.

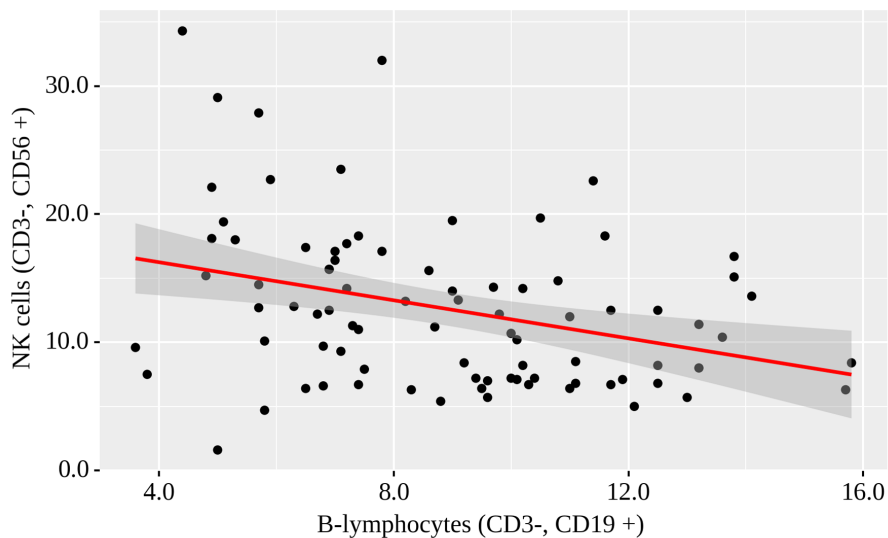
Аналіз моноцитів (CD14) з урахуванням групи після лікування

Змінна	Категорії	Моноцити (CD14)			p
		Me	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	n	
Група	контроль	8	7-9	30	0,014* p <sub>проміжний тип мікробіоти-контроль</sub> = 0,028 p <sub>бактерійний вагіноз-проміжний тип мікробіоти</sub> = 0,014
	проміжний тип мікробіоти	7	6-7	20	
	бактерійний вагіноз	7	7-8	65	

Встановлена залежність NK-клітин (CD3-, CD56+) від В-лімфоцитів (CD3-, CD19+) описується лінійним рівнянням регресії:

$$Y_{\text{NK клітини (CD3-, CD56+)}} = -0.743 \times X_{\text{В-лімфоцити (CD3-, CD19+)}} + 19,224.$$

Зі зменшенням на 1 одиницю В-лімфоцитів (CD3-, CD19+) очікується зміна NK-клітин (CD3-, CD56+) на 0,743 одиниці. Згідно з коефіцієнтом детермінації R<sup>2</sup> отриманої моделі, було описано 11,2% спостережуваної варіації NK-клітин (CD3-, CD56+, p<0,05).



Мал. 1. Регресійна лінія, яка характеризує залежність NK-клітин (CD3-, CD56+) від В-лімфоцитів (CD3-, CD19+).

Була оцінена помірна кореляція негативного зв'язку між цитотоксичними клітинами (CD3+, CD56+) та імунорегулювальним індексом (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+). Залежність цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+) від імунорегуляторного індексу (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+) описується лінійним регресійним рівнянням:

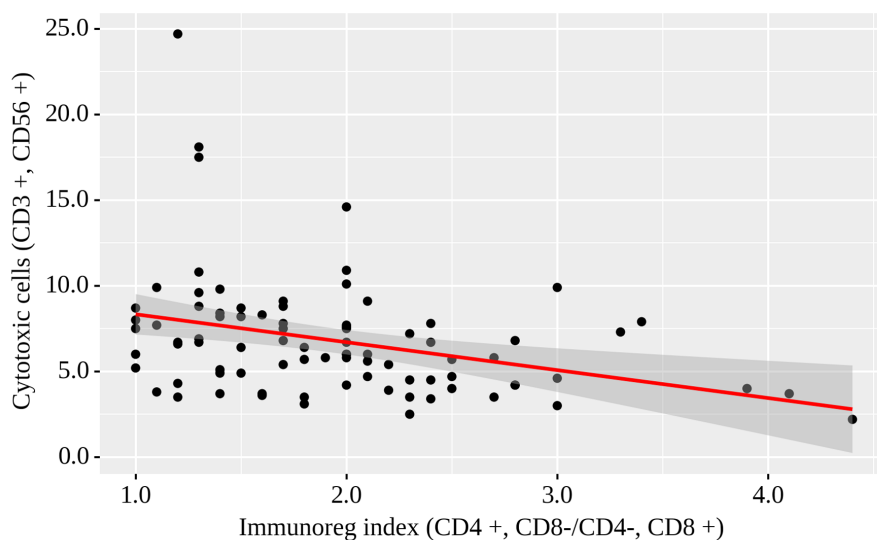
$$Y_{\text{Цитотоксичні клітини (CD3+, CD56+)}} = -1.63 \times X_{\text{Імунорегулювальний індекс (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+)}} + 9,965.$$

Зі зменшенням імунорегуляторного індексу (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+) на 1 одиницю очікується зміна цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+) на 1,63. Згідно з коефіцієнтом детермінації R<sup>2</sup> отриманої моделі, 11,3% спо-

стережуваної дисперсії цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+) пояснено (мал. 2).

#### ВИСНОВОК

При аналізі досліджуваних показників клітинної ланки імунітету в пацієнток з порушенням мікробіоти вагіни було встановлено статистично достовірне підвищення показників NK-клітин (CD3-, CD56+) та моноцитів (CD14) після лікування залежно від групи дослідження (p<0,05), що свідчить про вплив видового складу та комплексної терапії на рівні NK-клітин і моноцитів клітинної ланки імунітету. Після відновлення мікробіоти вагіни показники Т-супресорів/Т-цитотоксичних клітин (CD4-, CD8+) мали тенденцію до зростання.



Мал. 2. Залежність цитотоксичних клітин (CD3+, CD56+) від імунорегуляторного індексу (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+).

### Література

- Muzny, C. A., Taylor, C. M., Swords, W. E., Tamhane, A., Chattopadhyay, D., Cerca, N., & Schwebke, J. R. (2019). An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J. Infect. Dis.*, 220 (9), 1399-1405.
- Shcherbina, M. O., Plahotna, I. Yu., & Shcherbina, I. M. (2022). Evaluation of the effectiveness of non-drug therapy for pre-gravid preparation of women with bacterial vaginosis. *Collection of Scientific Works of the Association of Obstetricians and Gynecologists of Ukraine*, 1 (49), 67–72 [in Ukrainian].
- Klymnyuk, G. I., Mykhailyshyn, H. I., & Malanchuk, L. M. (2019). Microbiological features of bacterial vaginosis in women of different age categories and ways of their microbiological correction. *Zdobutky klinichnoi ta eksperymentalno i medytsyny – Achievements of Clinical and Experimental Medicine*, 3, 21–31 [in Ukrainian].
- Gruzevskiy O. A. (2019). Bacterial vaginosis: a condition of the immune system. *Herald of Marine Medicine*, 2, 128–134 [in Ukrainian].
- Mykhailyshyn, G. I., Klymniuk, S. I., & Malanchuk L. M. (2021). Restoration of the vaginal microbiome in bacterial vaginosis with the use of dialak probiotic. *Infectious Diseases*, 4, 18–23 [in Ukrainian].
- Gruzevskii, O. A., Minukhin, V. V., & Dzygal, A. F. (2020). State of non-specific immunity in bacterial dysbiosis and bacterial vaginosis. *Medical Science of Ukraine*, 1, 8–15. [in Ukrainian].
- Prymak, O. O., & Henyk, N. I. (2022). Clinical and diagnostic aspects of the mucosal ecosystem in recurrent bacterial vaginosis in women of reproductive age with exo-endocervix pathology. *Topical Issues of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology*, (1), 5-10.
- Li, D., Chi, X. Z., Zhang, L., Chen, R., Cao, J. R., Sun, X. Y., Yang, H.Q., Liao, Q.P. (2020). Vaginal microbiome analysis of healthy women during different periods of gestation. *Biosci. Rep.*, 40 (7).
- Lewis, W. G., Robinson, L. S., & Perry J. (2012). Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J. Biol. Chem.* 287( 3), 2079–2089.
- Redelinghuys, M. J., Geldenhuys, J., Jung, H., & Kock, M. M. (2020). Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 354
- Mykhailyshyn, H. I. (2023). Analysis of the T-cell link of immunity in women with a violation of the vaginal microbiota under the influence of complex treatment. *Medychna ta klinichna khimiya – Medical and Clinical Chemistry*, (3), 144–150 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14122>
- Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., & Bulla, R. (2019). Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Frontiers in immunology*, 10, 2387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02387>
- Ostafiichuk S., Polishchuk I., Perkhulyn O., Kusa O., Henyk N., Makarchuk O., Kurovets L., & Kutsyk R. ( 2022 ). Microbiological Assessment of Glycyrrhizic Acid Effectiveness in Bacterial Vaginosis – A Comparative Study. *Galician Medical Journal*, 29(4), E202243.

## INFLUENCE OF BACTERIAL VAGINOSIS ON THE DEVELOPMENT OF CELLULAR IMMUNITY DISORDERS IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE

H. I. Mykhailyshyn

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

**SUMMARY.** *The immunological response to bacterial vaginosis remains poorly understood. The vaginal microbiota can affect the function of the body's immune system. The ability of microorganisms to modulate the local and systemic immunological response requires a complex dialog between innate and adaptive components of the immune system. Since the mucosal immune system is quite unique compared to other mucosal surfaces, it can adapt to the menstrual cycle in response to hormonal stimuli.*

**Materials and methods.** *The study was conducted in 115 women of reproductive age with vaginal microbiota disorders. After studying the species composition of the vaginal microbiota, appropriate examination groups were formed: the first control group (with normocenosis of the vagina, n=30), the second group (intermediate type of microbiota, n=20) and the third group (bacterial vaginosis n=65).*

*For the treatment of bacterial vaginosis in women of the third group, according to the protocol for the treatment of «Abnormal vulvovaginal discharge», we chose the antibiotic metronidazole. In the second group with an intermediate type of vaginal microbiota, a probiotic containing the live strain of Lactobacillus casei IMB B-7280 was used to normalize the species composition and in patients of the third group with bacterial vaginosis to restore the vaginal microbiota once a day in the form of capsules and suppositories.*

*After the use of complex therapy to restore the vaginal microbiota in the study groups, the indicators of the cellular immunity link were studied before treatment and 1 month after treatment.*

**Results and discussion.** *In the study of the cellular component of immunity in the studied groups of patients*

*of reproductive age with vaginal microbiota disorders before treatment, no statistically significant changes in the levels of the immunoregulatory index (CD4+, CD8-/CD4-, CD8+), cytotoxic cells (CD3+, CD56+), NK cells (CD3-, CD56+), B lymphocytes (CD3-, CD19+), monocytes (CD14) and they were within the reference norms. However, after the treatment, statistically significant differences in NK cells (CD3-, CD56+) and monocytes (CD14) were investigated depending on the study groups. A moderate negative correlation between B-lymphocytes (CD3-, CD19+) and NK cells (CD3-, CD56+) was assessed. After probiotic therapy, there was a tendency to increase NK cells (CD3-, CD56+) and monocytes (CD14) in the control group.*

**Conclusions.** *Thus, in the analysis of the studied indicators of the cellular link of immunity in patients with vaginal microbiota disorders, statistically significant changes in NK cells (CD3-, CD56+) (p=0.025) and monocytes (CD14) (p=0.014) after treatment were found depending on the studied groups.*

**Key words:** *bacterial vaginosis; vaginal microbiota; probiotic; lactobacilli; reproductive age; T-cells; B-cells; cellular immunity; antibiotics.*

### Відомості про автора:

Михайлишин Галина Іванівна – асистентка кафедри мікробіології, вірусології та імунології ТНМУ; e-mail: mykhailyshyn@tdmu.edu.ua

ORCID ID: 0000-0001-7038-057X

### Information about the author:

Mykhaylyshyn H. I. – assistant of the Microbiology, Virology and Immunology Department TNMU; e-mail: mykhailyshyn@tdmu.edu.ua

ORCID ID: 0000-0001-7038-057X

Конфлікт інтересів: немає.

Author has no conflict of interest to declare.

Отримано 10.10.2023 р.