



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

ИМУНОПАТОГЕНЕТСКИ МЕХАНИЗМИ ПЕРЗИСТЕНЦИЈЕ ХЛАМИДИЈА У  
ГЕНИТАЛНОМ ТРАКТУ ЖЕНА

### Кључне речи :

*C. trachomatis*, cHSP60, Treg, DC, IFN- $\gamma$ , IL-10

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

*Chlamydia trachomatis* је најчешћи сексуално преносиви бактеријски узрочник широм света. Код жена, инфекција *C. trachomatis* у великом проценту оболелих (20%-40%) упркос активацији имунолошких механизма одбране, може довести до перзистентне инфекције јајовода, развоја пелвичне инфламаторне болести, формирања ожиљног ткива и оклузије јајовода, са тешким компликацијама у виду следственог тубарног инфертилитета. Процењено је да је готово 50% инфертилитета код жена узроковано хламидијалним инфекцијама.

Док су механизми перзистенције, као и улоге IL-10, T регулаторних и Th1 ефекторних лимфоцита који продукују IL-10 у неким експерименталним моделима, у великој мери разјашњени, значај ових механизма у настанку перзистенције и имунопатолошког оштећења код инфекција хламидијама је готово у потпуности непознат.

Основни циљ планираног истраживања је да се утврде имуно-патогенетски механизми који се налазе у основи перзистентне хламидијалне инфекције, као и постојање евентуалне повезаности између сероваријанти *C. trachomatis*, функционалних и фенотипских карактеристика мононуклеарних леукоцита и нивоа тубарног оштећења.

У истраживање ће бити укључене пацијенткиње са потврђеном инфекцијом *C. trachomatis*: група А - без оклузије јајовода и секундарног стерилитета и група Б - са оклузијом јајовода и секундарним стерилитетом. Контролну групу Ц - чиниће здраве испитанице.

У узорцима цервикалног бриса, присуство *C. trachomatis* ће се утврдити PCR техником. Присуство и фенотип T регулаторних (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- $\gamma$ /IL-10 Th1) и дендритских ћелија (pDC, mDC) у мукози цервикса жена ће се одредити методом проточне цитометрије. Концентрација цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, TGF- $\beta$ ) и антихламидијалних антитела (анти-MOMP, анти-cHSP60 и анти-cHSP10) ће се одређивати у узорцима плазме и цервикалног испирка ЕЛИЗА методом. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет СПСС.



### Циљ истраживања

Основни циљ планираног истраживања је да се утврде имуно-патогенетски механизми који се налазе у основи перзистентне хламидијалне инфекције тј., да се испитају функционалне и фенотипске карактеристике мононуклеарних леукоцита пацијенткиња са хламидијалном инфекцијом, као и евентуална повезаност ових параметара са нивоом тубарног оштећења.

### Актуелност истраживања

*Chlamydia trachomatis* је најчешћи сексуално преносиви бактеријски узрочник широм света (1, 2). Код жена, инфекција *C. trachomatis* има јединствени клинички аспект. У доњем гениталном тракту инфекција најчешће протиче асимптоматски (60-80%), да би се у великом проценту оболелих (20%-40%) инфекција проширила на горњи генитални тракт где захваљујући способности хламидија да опстану, упркос активацији имунолошких механизма одбране, може довести до перзистентне инфекције јајовода и развоја пелвичне инфламаторне болести, уз евентуално формирања ожиљног ткива и оклузију јајовода, са тешким компликацијама у виду следственог тубарног инфертилитета или ектопичне трудноће (1-4). Процењено је да је готово 50% инфертилитета код жена узроковано хламидијалним инфекцијама (5).

Који су то фактори који условљавају да код већине жена инфекција спонтано пролази, док код других постаје перзистентна и доводи до компликација још увек није разјашњено. За настанак тубарне оклузије и секунданог инфертилитета се у највећој мери окривљује имунски одговор на инфекцију. Постоји неколико хипотеза које покушавају да објасне патогенезу перзистентне хламидијалне инфекције.

**Целуларна хипотеза** подразумева да проинфламаторни цитокини (TNF, IL-1, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) које продукују, како имунске ћелије које учествују у одбрани од инфекције, тако и ћелије инфициране хламидијама, директно доводе до оштећења инфицирног ткива јајовода (6). Наиме, имунски и инфламаторни одговор, који се развијају услед присуства хламидија, доводе до инхибиције репликације ретикуларних тела, при чему настају велике, аберантне, нерепликативне, перзистентне интрацелуларне форме хламидија, које су резистентне на механизме имунске одбране. Услед инхибиције репликације и смањења броја елементарних тела испод критичне тачке, имунски и инфламаторни одговор се гасе, а перзистентна форма поново прелази у репликативни. Перзистентно присуство хламидија у епителу гениталног тракта и наизменични циклуси репликације и активације имунског одговора доводе до формирања ожиљног ткива и оклузије јајовода (4).

**Имунобиолошка хипотеза** указује да на исход инфекције у највећој мери утиче тип имунског одговора који се развија у контакту са хламидијама (7). Поларизација у правцу Th1 имунског одговора, уз активацију CD4<sup>+</sup> лимфоцита који продукују IFN- $\gamma$  и активација макрофага доводе до елиминације узрочника и престанка инфекције (8). Насупрот томе, активација Т регулаторних ћелија које продукују IL-10, у раној фази инфекције може довести до инхибиције протективног имунског одговора и развоја перзистентне инфекције (7). Који ће подтип Т лимфоцита доминирати у имунском одговору на стране антигене, зависи од бројних фактора. Са једне стране, врста и карактеристике антигена хламидија (MOMP, cHSP-60) на које имунски систем одговара, као и механизми којима хламидије избегавају имунски одговор са



друге стране су свакако најзначајнији фактори који одређују тип имунског одговора и исход инфекције.

**Алтернативна могућност** која обједињује предходне хипотезе је да способност хламидија да опстану интрацелуларно упркос активацији имунског одговора, и настанак аберантних форми које доводе до перзистентне инфекције условљавају развој пролонгираног инфламаторног одговора који доводи до колатералног оштећења ткива, што следствено индукује регулаторне механизме само-контроле (Treg, IL-10) који спречавају настанак имунопатолошког оштећења ткива, али и омогућавају даљу перзистенцију хламидија (9, 10).

Док су механизми перзистенције и спречавања настанка проинфламаторног оштећења, као и улоге IL-10, T регулаторних и Th1 ефекторних лимфоцита који продукују IL-10 у неким експерименталним моделима паразитарних интрацелуларних инфекција, у великој мери разјашњени, значај ових механизма у настанку перзистенције и имунопатолошког оштећења код инфекција хламидијама је готово у потпуности непознат.

#### **Предмет и опис истраживања, задачи, методологија, очекивани резултати:**

##### А. Задачи истраживања:

1. Утврдити присуство *C. trachomatis* у брису цервикса испитаница дефинисаних група.
2. Одредити титар антитела специфичних за MOMP и cHSP60 у периферној крви и цервикалном испирку испитаница дефинисаних група.
3. Утврдити присуство и фенотип регулаторних Т-лимфоцита у мукози цервикса испитаница дефинисаних група.
4. Утврдити присуство и фенотип дендритичних ћелија у мукози цервикса испитаница дефинисаних група.
5. Испитати профил секретованих цитикина у периферној крви и цервикалном испирку испитаница дефинисаних група.
6. *In vitro* испитати имуномодулаторне ефекте cHSP60 на профил секретованих цитикина у култури мононуклеарних леукоцита периферне крви и цервикса испитаница дефинисаних група.

##### Б. Пацијенти.

У истраживање ће бити укључене пацијенткиње са потврђеном инфекцијом *C. trachomatis*: група А - без оклузије јајовода и секундарног стерилитета и група Б - са оклузијом јајовода и секундарним стерилитетом. Контролну групу Ц - чиниће здраве испитанице.

##### Ц. Методологија.

###### *Опити протокол:*

Испитаницама ће се узимати 10мл хепаринизоване периферне крви, 5мл цервикалног испирка, цервикални брис и узорак цервикалних ћелија помоћу цервикалне четкице. Мононуклеарни леукоцити ће се добијати из венске крви и узорака добијених помоћу



цервикалне четкице, помоћу густинског градијента (Lymphoprep 1.077). Мононуклеарни леукоцити, узорци плазме и цервикалног испирка (након одвајања ћелија) ће се чувати на  $-70^{\circ}\text{C}$  до извођења есеја.

*Лабораторијска дијагноза инфекције *C. trachomatis* у узорцима цервикалног бриса ће се поставити методама индиректне флуоресценце и техником PCR.*

*Фенотипизација Т регулаторних ћелија ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- $\gamma$ /IL-10 Th1) и дендритских ћелија (pDC, mDC) у мукози цервикса ће се одредити методом проточне цитометрије.*

*Одређивање концентрације цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, TGF- $\beta$ ) и анти-хламидијалних антитела (анти-MOMP, анти-cHSP60) ће се одређивати у узорцима плазме и цервикалног испирка ЕЛИЗА методом.*

*Имуномодулаторни ефекти cHSP60 на продукцију цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, TGF- $\beta$ ), као и *ex vivo* продукција цитокина одређиваће се у 24h култури изолованих мононуклеарних леукоцита периферне крви и мукозе цервикса ЕЛИЗА методом.*

*Статистичка обрада:* Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима концентрације IFN- $\gamma$  и IL-10, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за т-тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G\*Power3. На основу претпоставке која захтева већи узорак (IL-10), утврђен је дефинитивни број испитаница према групама и то: здраве, 40 испитаница, хламидија позитивне фертилне, 54 испитаница и хламидија позитивне инфертилне, 54 испитаница (**укупан узорак од 148**). Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или Mann-Whitney U тестом) између три групе испитаница, са снагом студије  $\geq 80\%$ . За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS.

*Очекивани резултати:*

Сходно подацима из литературе који се односе на експерименталне моделе интрацелуларних паразитарних инфекција и клиничких студија у којима је испитиван хуморални имунски одговор на *C. trachomatis*, можемо претпоставити да код пацијенткиња са потврђеном инфекцијом и пратећом оклузијом јајовода доминира пролонгирани инфламаторни одговор: висок ниво серумског IFN- $\gamma$  и висок титар анти-cHSP60 антитела, уз следствену индукцију регулаторних механизма само-контроле: висок ниво серумског IL-10 и TGF- $\beta$ , присуство Т регулаторних ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg, IL-10 Treg) и/или IFN- $\gamma$ /IL-10 Th1 и плазмацитоидних дендритских ћелија (pDC).

### **Значај истраживања**

Механизми који доводе до перзистенције хламидија у гениталном тракту жена су недовољно познати. Неспорна је само једна чињеница: тубарна оклузија последица је пролонгиране инфламације која се јавља као одговор на перзистентну инфекцију. Обзиром да присуство, фенотип, као и функција Т регулаторних лимфоцита и дендритских ћелија у инфекцијама изазваним *C. trachomatis* до сада нису истраживани, утврђивање евентуалне повезаности између, функционалних и фенотипских карактеристика мононуклеарних леукоцита и нивоа тубарног оштећења, може пружити не само значајан увид у имунопатогенетске



механизме који леже у основи перзистентне хламидијалне инфекције, већ могу представљати и основу евентуалне терапије која би била усмерена не само на ерадикацију узročника већ и на превенцију настанка имунопатолошког оштећења ткива и тешких компликација у виду следственог тубарног инфертилитета или ектопичне трудноће.

### Временски оквир

Сходно величини студијског узорка (здраве испитанице 40, хламидија позитивне фертилне 54, и хламидија позитивне инфертилне 54) и броју хламидијалних инфекција које се на годишњем нивоу дијагностикују у Диспанзеру за жене ДЗ и Гинеколошкој Клиници КЦ у Крагујевцу, предвиђено је да ова студија траје 12 месеци.

### Литература

1. **Manavi K.** A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2006; 20: 941-951.
2. **Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE.** Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1998; 351: S2-S4.
3. **Paavonen J, Eggert-Kruse W.** *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Human Reproduction Update* 1999; 5: 433-447.
4. **Witkin SS.** Immunological aspects of genital *Chlamydia* infections. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2002; 16: 865-874.
5. **Bevan CD, Johal BJ, Mumtaz G, Ridgway GL, Siddle NC.** Clinical, laparoscopic and microbiological findings in acute salpingitis : report on a United Kingdom cohort. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1995; 102: 407-414.
6. **Stephens RS.** The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in Microbiology* 2003; 11: 44-51.
7. **Brunham RC, Rey- Ladino J.** Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 149-161.
8. **Morrison RP, Caldwell HD.** Immunity to murine chlamydial genital infection. *Infection Immunity* 2002; 70: 2741-2751.
9. **Sakaguchi S.** Regulatory T cell: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunology* 2003; 4: 10-11
10. **O' Garra A, Vieira LP, Vieira P, Goldfeld EA.** IL-10 – producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *Journal Clinical Investigation* 2004; 114: 1372-1378.

### Руководилац пројекта:

проф. др Дејан Баскић

### Главни истраживач:

проф. др Дејан Баскић

### Ангажовани истраживачи:

Асс. Александар Арсовић

Асс. Александра Димитријевић

Сузана Поповић, истраживач сарадник