

CELULARNI IMUNITET BOLESNICA SA REKURENTNOM GENITALNOM KANDIDOZOM

Suzana TASIĆ, Gordana TASIĆ, Predrag VLAHOVIĆ i Nataša MILADINOVIĆ

Institut za zaštitu zdravlja u Nišu

Ispitivanjem parametara celularne imunosti obuhvaćeno je 20 žena koje boluju od rekurentne genitalne kandidoze (RGK) u fazi remisije i 20 žena kontrolne grupe koje nikada nisu imale verifikovanu genitalnu gljivičnu infekciju.

Cilj istraživanja je bio utvrditi produkciju interferona-gama (IFN- γ) u kulturi specifično (antigenima *Candida albicans*-HKB) i nespecifično (Concavalin-A-ConA) stimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi žena sa RGK, kao i zdravih žena radi utvrđivanja eventualnog postojanja hiporeaktivnosti sistemskog celularnog imuniteta.

IFN- γ je određivan kvantitativnom imunoenzimskom metodom Quantikine (R/D sistem, Minneapolis, USA).

IFN- γ je dokazan u minimalnim količinama u kulturama limfocita stimuliranih specifičnim antigenom (srednja vrednost - 15 pg/ml). Znatno veća vrednost produkovanog IFN- γ dokazana je u kulturama ConA stimuliranih limfocita (srednja vrednost - 954 pg/ml) kao i pri ConA i HKB stimulisu limfocita (srednja vrednost - 1247 pg/ml). Poređenjem produkovanog IFN- γ u kulturama specifično i udruženo stimuliranih limfocita žena sa RGK (IFN- γ -HKB-15 pg/ml, ConA i HKB-1115 pg/ml) kao i žena kontrolne grupe (IFN- γ -HKB-16 pg/ml, ConA i HKB-1371 pg/ml) nisu zabeležena značajna odstupanja, niti statistički značajna razlika.

Ključne reči: rekurentna genitalna kandidoza, interferon- γ , celularni imunitet

Uvod

Milioni žena, na kraju drugog milenijuma, boluju od upornih genitalnih gljivičnih infekcija uprkos brojnim tretmanima koji se prezentuju kao delotvorni i efikasni.

Obligatni literaturni podaci su da u svetu tri četvrtine žena bar jednom u životu oboli od vaginalne gljivične infekcije. Činjenica je i da 50% dela populacije žena, ovaj iskustveni atak proživi dva ili više puta u toku svog života.

Najzanimljiviji za naučnike je podatak da 5% žena boluje od rekurentne genitalne kandidoze (RGK), bolesti koju karakteriše tri ili više epizoda gljivične genitalne infekcije u toku godine. Zanimljivost ove statističke realnosti je u tome da kod ovih žena najznačajniji faktori rizika kao što su trudnoća, diabetes mellitus, dugotrajna upotreba antibiotika, citostatika, hormonske terapije, idiopatska i stečena imunodeficijentna stanja ostaju neverifikovani.

Referentna literatura je bogata kontraverznim faktima o uzroku hronične epizodne vaginalne kandidoze. Postulat, čije je dokazivanje obeležilo poslednju dekadu istraživanja u ovoj oblasti, kao uzrok RGK ističe *Candida*-antigen specifičnu supresiju celularnog imunskog odgovora.

Cilj rada je bio utvrditi produkciju interferona-gama (IFN- γ) u kulturi specifično i nespecifično stimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi žena sa RGK kao i zdravih žena. Na osnovu produkovanog IFN- γ medijatora Th-1 imunskog odgovora ispitati celularnu imunsku reaktivnost kod žena sa dugotrajnim genitalnim gljivičnim infekcijama.

Materijal i metode rada

Ispitivanjem parametara celularne imunosti obuhvaćeno je 20 žena sa RGK koje su se u trenutku istraživanja nalazile u fazi remisije (A-grupa). Kontrolnu grupu u imunskim istraživanjima činilo je 20 zdravih žena koje ne pate od RGK i koje nikada nisu imale verifikovanu genitalnu kandidozu (B-grupa).

Ispitivanje funkcije sistemskog celularnog imuniteta obuhvatilo je ispitivanje *in vitro* produkcije IFN- γ , u supernatantima stimuliranih kultura mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitivanih žena. Proliferacija limfocita i produkcija IFN- γ stimulirana je specifičnim partikularnim nestandardizovanim antigenom gljiva roda *Candida* (toplotom ubijene blastospore vrste *Candida albicans*-heat killed blastospores-HKB); nespecifičnim, standardnim mitogenom Concanavalin-A (ConA) i udruženim dejstvom HKB+ConA.

Mononuklearne ćelije su odvajane iz heparinizovane (50 IU/ml) sveže periferne krvi ispitivanih žena na limfoprepu Nycomed (Farma). Izolovane mononuklearne ćelije ispirane su dva puta u RPMI 16/40. Mononuklearne ćelije kultivisane su u količini od 2×10^6 ćelija/ml u RPMI 16/40 medijumu sa dodatkom 20% fetal-calf seruma; 20% HEPES-a u količini od 20 mM; streptomycin-a 100 ul/ml; penicillin-a 100 ul/ml i glutamina u količini 2 mM.

- Kulture limfocita stimulirane su specifičnim antigenom HKB u količini 106 cel/ml;
- standardnim mitogenom ConA u količini od 25 u.g/ml, i
- udruženim dejstvom HKB (106 cel/ml)+ConA (25 ag/ml).

• Četvrta kultura ćelija inkubirana je bez antigena i služila je kao kontrola.

Mononuklearne ćelije kultivisane su 48 sati na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂.

IFN-y je određivan kvantitativnom imunoenzimskom metodom Quantikine (R&D sistem, Minneapolis, USA).

Rezultati rada

Za IFN-y, kao kontrola u imunoenzimskom testu po uputstvu proizvođača, korišćeno je 8 standarda koncentracije od 0-1000 pg/ml.

Kod sedam žena ispitana je produkcija citokina u kulturama stimulisanih i nestimuliranih limfocita. Mitogeni efekat, uz produkciju citokina, utvrđen je na dejstvo specifičnog antigena HKB, standardnog mitogena ConA i udruženo dejstvo oba antigena HKB+ConA.

IFN-y nije detektovan u kontrolnim kulturama nestimuliranih mononuklearnih ćelija krvi. IFN-y je otkriven u kulturama specifično i nespecifično stimuliranih limfocita.

Tabela 1. Produkcija IFN-y, HKB, ConA, ConA+HKB stimuliranih mononuklearnih ćelija

IFNy (pg/ml)	Br	K	HKB stimulus	ConA stimulus	ConA+HKB stimulus
	7	<LD	15.43±7.59(16)	954±426 (1145)	1247±526(1190)

Daće su SV (srednja vrednost), SG (standardna greška), u zagradama M (medijana). p < 0,05, K (kontrola), LD - limil detekcije - IFN-y = 3 pg/ml;

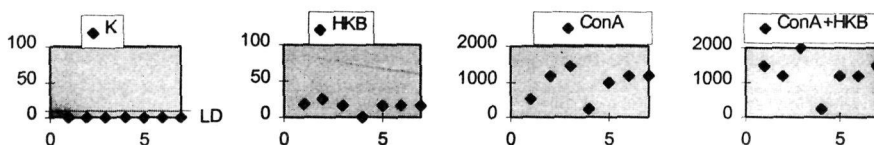
HKB stimulirani limfociti produkovali su minimalne količine IFN-y [max-25 pg/ml, srednja vrednost (SV)-15 pg/ml]. Značajno veća produkcija IFN-y utvrđena je u kulturama ćelija stimuliranih ConA i ConA+HKB (max 2020 pg/ml; SV-ConA-954 pg/ml; SV-ConA+HKB-1247 pg/ml). Poređenjem produkcije IFN-y, nešto veće količine ovog citokina utvrđene su u kulturama stimuliranim ConA+HKB u odnosu na kulture ćelija stimulirane samo standardnim mitogenom ConA (tabela 1, grafikon 1).

Kvantitativno je određena produkcija IFN-y u kulturama ConA+HKB i HKB antigenom stimuliranih limfocita svih 40 ispitivanih žena.

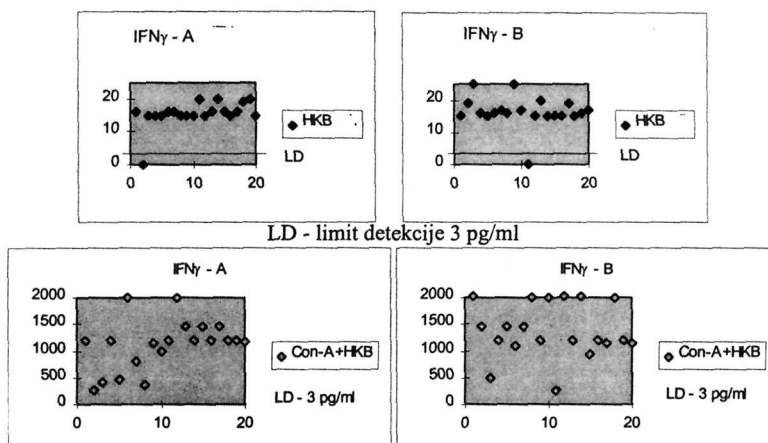
Tabela 2. Interferonska produkcija stimuliranih mononuklearnih ćelija

Gr.	N	Con-A+HKB stimulus (IFN-ypg/ml)	M	SD	HKB stimulus (IFN-y pg/ml)	M	SD
A	20	1115±108	1185	472	15.50±0.94	15.50	4.08
B	20	1371±118	1187	515	16.40±1.13	16.00	4.91

Daće sti SV, SG, u zagradama M. SD - standardna devijacija, p < 0,05



Grafikon 1. Produkcija IFN- γ , HKB, ConA, ConA+HKB stimulisanih mononuklearnih ćelija



Grafikon 2. Produkcija IFN-g mononuklearnih ćelija nakon Con-A+HKB i HKB stimulacije

Količina produkovanog IFN-y u ConA+HKB stimulisanim kulturama limfocita žena sa RGK kretala se od 262-2000 pg/ml; SV-1115 pg/ml, i nije se razlikovala od produkcije IFN-y na isti način stimulisanih limfocita žena kontrolne grupe 250-2020 pg/ml; SV-1371 pg/ml (tabela 2, grafikon 2).

Nije utvrđena značajna razlika ni u količini produkovanog IFN-y od strane HKB stimulisanih limfocita. Srednja vrednost produkovanog IFN-y kod žena test grupe iznosila je 15 pg/ml, a kod žena kontrolne grupe 16 pg/ml.

Diskusija i zaključak

S obzirom na odlučujuću ulogu celularnog imuniteta u patogenezi superficijalnog oblika kandidoza, od 1987. godine najveći broj istraživanja, obavljenih sa ciljem razrešenja praktičnog i naučnog problema RGK, bavio se ispitivanjem uticaja ćelijskog imunskog odgovora na nastanak, evoluciju i prognozu genitalnih gljivičnih infekcija (*Rich, 1996*).

Veći broj značajnih podataka potiče iz analiza celularnih mehanizama zaštite u toku eksperimentalno izazvane vaginalne kandidoze, korišćenjem animalnih modela.

Manji broj studija obuhvatio je i ispitivanje celularnog imuniteta žena sa RGK.

Prvi značajni podaci o celularnoj imunskoj reaktivnosti kod žena sa dugotrajnom vaginalnom kandidozom prikupljeni su ispitivanjem kožnog testa preosetljivosti na *Candida* antigene. Mnogi autori su ispitivanjem ovog testa celularnog imunskog odgovora utvrdili da kod žena sa RGK kožni test na *Candida* antigene pokazuje nereaktivnost ili smanjenu reakciju. Ovu hiporeaktivnost većina autora je obrazložila kao posledicu određenog tipa antigen-specifične supresije sistemskog celularnog imunskog odgovora, jer je kožni test na druge antigene, kod bolesnica sa RGK, pokazivao standardnu reaktivnost. Po ovim nalazima nametao se logični zaključak da žene koje pate od RGK imaju redukovanu funkciju celularnog imunskog odgovora na *Candida* antigene, što za posledicu ima veću osetljivost za gljivične infekcije pa može biti i uzrok rekurentnosti kandidoze (*Fidel and Sobel, 1996; Watanabe et al., 1991; Witkin et al., 1991*).

Radi ispitivanja celularnog imuniteta žena sa RGK, u uslovima *in vitro*, korišćeni su testovi specifične i nespecifične stimulacije proliferacije limfocita. Kao i u drugim analizama i imunske probe dale su kontradiktone podatke.

Witkin et al. (1986, 1983, 1988, 1991) dokazali su redukovani proliferativni odgovor limfocita periferne krvi žena sa RGK koji su stimulisani *Candida* antigenima.

Fong et al. (1992) ističu da ispitivanjem proliferacije limfocita na različite antigene, uključujući i antigene *Candida albicans*, nema značajne razlike u proliferativnom odgovoru limfocita žena sa RGK bilo pri specifičnoj ili nespecifičnoj stimulaciji.

Tezu da je uzrok RGK žena postojanje antigen specifične supresije sistemskog celularnog imunskog odgovora proveravaju i drugi autori (*Fidel and Sobel, 1996*).

Jednu grupu eksperimentalnih miševa *Sobel i Fidel* (1996) su imunizovali antigenima *Candida sp.* Celularnu imunsku aktivnost tipa reakcije kasne preosetljivosti na sistemskom nivou verifikovali su praćenjem produkcije citokina od strane specifično i nespecifično stimulisanih limfocita periferne krvi i slezine. Utvrdili su da specifično stimulisani limfociti proizvode citokine Th1 imunskog odgovora, odnosno IFN- γ i IL2. Produkcija IL4

citokina Th2 odgovora nije dokazana. Kod druge grupe miševa izazvana je imunotolerancija na Candida antigene uzastopnim aplikovanjem većih doza pomenutih antigena. Intravaginalnom aplikacijom virulentnog soja vrste Candida albicans izazvana je vaginalna kandidoza kod obe grupe eksperimentalnih životinja. Gljivična infekcija se nije razlikovala ni u intenzitetu ni u vremenskom trajanju kod ispitivanih miševa.

Nalazi *Sobel-a* i *Fidel-a* (1996) ukazuju da niti sistemska celularna imunska reakcija, ni sistemska imunotolerancija nemaju uticaja na patogenezu genitalne kandidoze. Isti autori su dokazali da, ukoliko se prethodno opisani eksperiment ponovi ali kod estrogen netretiranih miševa, samo se tada intenzitet i trajanje genitalne kandidoze razlikuje u odnosu na ovu infekciju kod hormonski tretiranih životinja (*Fidel et al.*, 1993, 1990, 1993).

Korišćenjem anti CD4-antitela *Fidel* i *Sobel* (1996) su značajno remetili odnos CD4 i CDx limfocita u perifernoj krvi miševa, ali su uporno dobijali podatak da vaginalna kandidoza nije u odlučujućoj vezi sa promenama u broju imunokompetentnih ćelija celularnog imunskog odgovora na sistemskom nivou (*Fidel et al.*, 1995).

Mudro izbegavajući, već duže korišćeni, kontra-argument da miševi nisu ljudi, *Fidel* i *Sobel* (1996) poslednjih godina dobijaju iste rezultate i u istraživanjima urađenim sa većim brojem žena koje pate od RGK.

Činjenicu da sistemski imunski odgovor nema uticaja na patogenezu rekurentnog oblika genitalne kandidoze, ovi autori dokazuju korišćenjem kožnog testa preosetljivosti na Candida antigene i testa proliferacije limfocita stimulisanih nestandardizovanim solubilnim i partikularnim antigenima Candida albicans. Istraživanje je kod žena urađeno u toku manifestne infekcije i u periodu remisije.

Fidel i *Sobel* (1996) dokazuju manju reaktivnost kožnog testa preosetljivosti na Candida antigene u toku akutne infekcije ali se reaktivnost testa vraćala na normalni nivo u fazi remisije.

Proliferativni odgovor stimulisanih limfocita utvrđen je detekcijom medijatora Th1 imunskog odgovora (IFN- γ i IL2). Nalaz IFN- γ i IL2, kao i količina produkovanih citokina nije se razlikovala kod ispitivanih žena u različitim fazama infekcije. Razlike u produkciji medijatora Th1 odgovora nisu utvrđene ni među ispitivanim ženama.

Studijom *Fidel-a* i *Sobel-a* (1966) koja je obuhvatila žene sa RGK kao i istraživanjima na eksperimentalnim životinjama ovi autori nisu dokazali da je uzrok rekurentnosti gljivične infekcije postojanje hiporeaktivnosti sistemskog celularnog imunskog mehanizma zaštite. Sve ispitivane žene imale su normalni proliferativni odgovor limfocita periferne krvi na antigene vrste Candida albicans koji je verifikovan zadovoljavajućom produkcijom IFN- γ i IL2 citokina i u fazi manifestne infekcije i u toku remisije. Hiporeaktivnost na Candida antigene utvrđena kožnim testom pre je posledica nego uzrok rekurentnosti gljivične vaginalne infekcije.

Rezultati ova dva autora učvršćuju stav da se epizode RGK javljaju nezavisno od sistemskog celularnog imuniteta, niti su posledica promene reaktivnosti T-imunskog odgovora na sistemskom nivou.

Rezultati istraživanja dobijeni stimulacijom limfocita pokazuju značajnu razliku u produkciji citokina, do koje je došlo korišćenjem različitih antigena u kulturi ćelija. IFN-y je dokazan u minimalnim količinama u kulturama limfocita stimulisanih specifičnim antigenom. Znatno veća produkcija IFN-y dokazana je u kulturama limfocita stimulisanih ConA i ConA+HKB. U kulturama limfocita gde su za stimulaciju korišćena oba antigena utvrđena je neznatno veća količina produkovanog IFN-y u odnosu na kulturu limfocita stimulisane samo nespecifičnim antigenom.

Bez obzira na rezultate drugih studija, u kojima se kao dobar specifični antigen gljiva roda *Candida*, u proliferaciji limfocita, navodi partikularni antigen-toplotom ubijene blastospore vrste *Candida albicans*, rezultati našeg rada ukazuju da nakon 48-časovne kultivacije limfocita u prisustvu HKB antigena nema zadovoljavajuće produkcije citokina. Moguće je da ovaj antigen može dati veće produkovane količine citokina u toku duže inkubacije kultura HKB stimulisanih limfocita.

Poređenjem produkovanog IFN-y u kulturama specifično i udruženo stimulisanih limfocita žena sa RGK, kao i žena kontrolne grupe, nisu zabeležena značajna odstupanja. Srednja vrednost produkovanog IFN-y kod žena sa RKG u specifičnoj stimulaciji iznosila je 15 pg/ml i udruženom stimulacijom limfocita 1115 pg/ml. Kod žena kontrolne grupe dobijeni su slični nalazi (16 pg/ml za HKB i 1371 pg/ml za HKB+ConA).

Radom su utvrđene samo značajne individualne razlike u produkciji IFN-y. Rezultati istraživanja gotovo se u potpunosti podudaraju sa nalazima *Fidel-a* i *Sobel-a* (1966), jer je i našim istraživanjem potvrđeno da kod žena sa RGK ne postoji razlika u produkciji IFN-y u odnosu na zdrave žene kontrolne grupe.

Nalazi potvrđuju pretpostavku da hiporeaktivnost sistemskog celularnog imunskog odgovora nije uzrok obnavljanju genitalne kandidoze.

Literatura

Fidel, P. L., Lynch, M. E., Renondo-Lopez, V., Sobel, J. D. and Robinson, R. (1993). Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 168, 1458-1465.

Fidel, P. L., Lynch, M. E. and Sobel, J. D. (1993). *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.*, 61, 1990-1995.

Fidel, P. L., Lynch, M. E. and Sobel, J. D. (1993). *Candida*-specific Th type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, 61, 4204-4207.

Fidel, P. L., Lynch, M. E. and Sobel, J. D. (1995). Circulating CD4 and CD8 T cells have little impact on host defense against experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, 63, 2403-2408.

Fidel, P. L., Lync, M. E. and Sobel, J. D. (1994). Effects of preinduced Candida-specific systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis. Infect Immun., 62, 1032-1038.

Fidel, P. L. and Sobel, J. D. (1996). Immunopatogenesis of recurrent vulvo-vaginal candidiasis. Clin. Microbiol. Rev., 9, 335-348.

Fong, I. W., McCleary, P. and Read, S. (1992). Cellular immunity of patients with recurrent or refractori vulvovaginal moniliasis. Am. J. Obstet. Gynecol., 166, 887-890.

Rich, R.R.(1996). Clinical immunology. Principles and practice. Mosby. New York.

Watanabe, K., Kagana, K. and Yamada, T. (1991). Mechanism of candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. Infect. Immun., 59,521-521.

Witkin, S. S., Hirsch, J. and Ledger, W. J. (1986). A macrophage defect in women with recurrent Candida vaginitisand its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. Am. J. Obstet. Gynecol., 155, 790-795.

Witkin, S. S., I. R., Yu and Ledger, W. J. (1983). Inhibition of Candida albicans-inducedlymphocyte proiiferation by lymphocytes and sera from women with recurrent vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol., 147, 809-811.

Witkin, S. S., Jeremias, T. and Ledger, W.J. (1988). A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. J. Allergy Clin. Immunol., 81, 412-416.

Witkin, S. S., Jeremias, J. and Ledger, W. J. (1989). Vaginal eosinophils and IgE antibodies to Candida albicans in women with recurrent vaginitis. J. Med. Vet. Mycol., 27, 57-58.

Witkin, S. S., Kalo-Klein, A., Galland, L., Teich, M. and Ledger, W. J. (1991). Effect of Candida albicans plus histamin on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. J. Infect. Dis., 164, 396-399.

Wooley, P. D. and Higgins, S. P.(1995). Comparasion of clotrimazole, fluconazole and intraconazole in vaginal candidiasis. Br. J. Clin. Pract., 49, 65-66.

IMMUNITÉ CELLULAIRE DES MALADES AVEC LA CANDIDOSE RECURRENTE GÉNITALE

Suzana TASIĆ, Gordana TASIĆ, Predrag VLAHOVIĆ et Nataša MILADINOVIĆ

Institut pour la protection de la santé de Niš

L'examen des paramètres de l'immunité cellulaire a compris 20 femmes, attaquées par la candidose recurente génitale (RGK) dans la phase de remission et 20 femmes du groupe de contrôle qui n'avaient jamais eu l'infection candidose génitale vérifié. Le but de cette recherche est de constater la production de gama interférons

(IFN- γ) dans la culture spécifiquement (antigènes par *Candida albicans* - HKB) et nonspecifiquement (Concavalin-A-ConA) des cellules stimulées mononucléaires du sang périphérique des femmes avec RGK, ainsi que des femmes saines dans le but de constater l'existence éventuelle de l'hyporéactivité de l'immunité cellulaire de système.

IFN- γ est déterminé par la méthode qualitative immunoenzymatique Quantikine (R/D système, Minneapolis, USA).

IFN- γ est confirmé dans les quantités minimales dans les cultures des lymphocytes stimulés par l'antigène spécifique (la valeur moyenne - 15 pg/ml). La valeur beaucoup plus grande de IFN- γ produit est confirmée dans les cultures ConA des lymphocytes stimulés (valeur moyenne - 954 pg/ml) ainsi que chez ConA et HKB lymphocytes stimulés (la valeur moyenne - 1247 pg/ml).

Les mots clés: Candidose récurrente génitale, interféron- γ , immunité cellulaire

CELLULAR IMMUNITY OF THE PATIENTS SUFFERING FROM RECURRENT GENITAL CANDIDOSE

Suzana TASIĆ, Gordana TASTĆ, Predrag VLAHOVIĆ
and Nataša MILADINOVIĆ

Institute for health protection, Niš

The examination of the cellular immunity parameters comprised 20 women suffering from the recurrent genital candidose (RGK) in the remission phase as well as 20 women of the control group that never had any verified genital mucous infection. The aim of the research was to determine the interferon-gamma (INF gamma) production in the culture of specifically (by the *Candida albicans* - HKB-antigens) and non-specifically (Concavalin-A-ConA) stimulated mononuclear cells of the peripheral blood of the women with the RKG as well as of the healthy women for the sake of determining a possible presence of the system cellular immunity hypo-activity.

The IFN gamma was determined by the quantitative immuno-enzymic Quantikine method (R/D system, Minneapolis, USA).

The IFN gamma was confirmed in minimal quantities in the cultures of the lymphocytes stimulated by the specific antigen (average value - 15 pg/ml). A considerably higher value of the produced IFN gamma was confirmed in the cultures

of the stimulated lymphocytes (average value - 954 pg/ml) as well as at the ConA and the HKB lymphocyte stimulus (average value - 1247 pg/ml).

Key words: Recurrent genital candidose, interferon gama, cellular immunity

Autor: Ass. dr sci Suzana Tasić, specijalista za mikrobiologiju i parazitologiju, Institut za zaštitu zdravlja u Nišu; kućna adresa: Niš, Bulevar Nemanjića 29/43.

(Rad je Uredništvo primilo 24. decembra 1999. godine)

BUMETADIN

 **ZDRAVLJE**
LESKOVAC