

УДК 618.39

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ВЛАГАЛИЩА ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Червинец Ю.В., Червинец В.М., Стольникова И.И., Досова С.Ю.

ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России

***Аннотация:** данная статья посвящена изучению проблемы невынашивания беременности, в частности влагалищной микробиоты (спектр, частота встречаемости, количество, а также выделяемые ими газовые сигнальные молекулы) у пациенток с привычным невынашиванием беременности, как во время беременности, так и на этапе прегравидарной подготовки.*

***Ключевые слова:** привычное невынашивание беременности, микробиота влагалища, газовые сигнальные молекулы.*

THE FEATURES OF VAGINA MICROBIOTA IN WOMEN WITH HABITUAL MISCARRIAGE.

Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Stolnikova I.I., Dosova S.Y.

Tver State Medical University, Tver

***Abstract:** this article is devoted to the study of the problem of miscarriage in women, and in particular vaginal microbiota (spectrum, frequency, number and production of gas sygnale molecules) in patients with habitual miscarriage, both during pregnancy and at the stage of pregravid preparation.*

***Key words:** habitual miscarriage, vaginal microbiota, gas signal molecules*

Невынашивание беременности является одной из центральных проблем в современном практическом акушерстве и гинекологии, частота которой составляет 10—25 % всех беременностей, причем 80% от всего количества случаев невынашивания беременности приходится на I триместр. Около 25 % случаев невынашивания составляет привычный выкидыш, частота преждевременных родов — 4—10 % от общего числа всех родов. В числе других наиболее актуальных проблем она занимает одно из первых мест, поскольку, отрицательно влияя на уровень рождаемости, имеет не только медицинское, но и социально-экономическое значение.

Среди причин гибели плода многие рассматривают инфекцию в качестве ведущего этиологического фактора. Персистирующая инфекция, вирусная и бактериальная, является одной из основных причин невынашивания беременности. В большинстве случаев (более 80 %) инфицирование носит смешанный характер. Однако вагинальный микробиом женщины, который содержит примерно 10% женской микробиоты, играет исключительную роль в поддержании в физиологической норме мочеполового тракта, предупреждая развитие в нем патологических изменений. Вагинальный микробиом, содержащий не менее 50 видов микроорганизмов, находится в тесной симбиотической связи со структурными

компонентами влагалища и другими биотопами микробной экологической системы, а также с функциональной активностью всей мочеполовой системы, особенно ее иммунной и эндокринной деятельностью. Эстрогенные гормоны способствуют насыщению эпителия гликогеном, который используют в качестве основного питательного субстрата микроорганизмы, способные к его метаболизму [1,2,3,4,5,6,11].

Коммуникации между микроорганизмами реализуются посредством регуляторной системы, получившей название quorum sensing, в которой механизм авторегуляции развития микробных популяций осуществляется при достижении развивающейся культурой определенной плотности популяции [2,7].

Микроорганизмы в биопленке непрерывно обмениваются между собой сигнальными молекулами, активирующими или приостанавливающими развитие сообщества [9]. Представляет интерес простые сигнальные молекулы (CO, CO₂, NO, H₂S, и др.) которые могут свободно проходить через мембраны клеток и оказывать влияние не только на межмикробные взаимодействия, но и на различные стороны жизнедеятельности макроорганизма [8,10].

Цель исследования: Определить частоту встречаемости и количество микроорганизмов влагалища у беременных и небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности, а также выделяемые микробиотой простые газовые сигнальные молекулы.

Материалы и методы: Для исследования брали мазки из влагалища у женщин, которые были разделены на 4 группы: 1-я группа - здоровые беременные женщины (n=15), 2-й группа – здоровые небеременные женщины (n=15), 3-й группа - беременные с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) (n=16), 4-й группа - небеременные с ПНБ (n=15).

Забор материала делали утром до мочеиспускания стерильным тампоном на полистироловой палочке с площади 1 см² и в течение 2-х часов доставляли в бактериологическую лабораторию.

Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий использовали среды – Эндо для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера, M 304 - стрептококковый агар, МРС - лактоагар, HiCrome, Сабуро декстроза агар, Колумбия кровяной агар, хромогенные среды для выявления дрожжевых грибов рода Candida, стрептококков и энтерококков (HiMedia). Для культивирования анаэробов использовали среды бифидоагар и кровяной Шедлер агар. Анаэробные условия создавались в анаэроостатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Количество колоний выражали в lg КОЕ/см². Идентификация осуществлялась по биохимической активности с применением API систем «BioMérieux Vitek, Inc.» (Франция). В работе был использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито (ДиаМорф, Россия).

Результаты:

В 1 группе здоровых беременных женщин (рис. 1) микробиом влагалища представлен в основном бактериями рода *Enterococcus* (60% обследованных пациенток), стафилококками и стрептобациллами (53,3%), стрептококками и клебсиеллами (46,7%), бактероидами, бациллами (40%), клостридиями, лактобациллами (27%), в 20% случаев выделялись *Staphylococcus aureus*, вейлонеллы, микрококки и пептострептококки, в 13,3% - *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, пептококки, в 6,7% - бифидобактерии и гарднереллы.

В количестве от 4,7 до 6,2 lg КОЕ/см² выделялись клебсиеллы, пептококки, пептострептококки, клостридии, вейлонеллы, бактероиды, стрептобациллы, гарднереллы, *Candida albicans*. В количестве от 2,4 до 3,87 lg КОЕ/см² высевались *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*, *Bacillus subtilis*, стрептококки, энтерококки, микрококки, лактобациллы, *Proteus vulgaris*.

Во 2-й группе здоровых небеременных женщин (рис. 2) чаще выделялись *Lactobacillus spp.*- 64% выявлений, *Enterococcus spp.* (58%), *Bifidobacterium spp.* (48%). Реже выделялись *Staphylococcus epidermidis*, *Peptococcus spp.*, (3%), *Peptostreptococcus spp.* и (33%), *Bacillus spp.* (27%), *Candida albicans* (21%), *Bacteroides spp.*, (18%) и менее 10% приходилось на *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Gardnerella spp.*, *Actinomyces spp.*

Количество микроорганизмов варьировало (рис. 2) от 2,2 lg КОЕ/см² у золотистого стафилококка до 6,77 lg КОЕ/см² у гарднерелл. Количество лактобацилл в среднем составляло 3,8 lg КОЕ/см², количество энтерококков, бифидобактерий, пептококков, пептострептококков, бактероидов, микрококков, вейлонелл - более 4 lg КОЕ/см².

В 3-й группе беременные с привычным невынашиванием беременности (рис. 3) в основном выделялись энтерококки и эпидермальные стафилококки (62,5%), в менее чем 50% изолировали *Klebsiella pneumoniae* (43,75%), *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, стрептобациллы, лактобациллы выявлялись в 37,5%, *Staphylococcus aureus*, стрептококки и пептострептококки – в 25%, *E.coli*, бифидобактерии, вейлонеллы, актиномицеты – в 12,5% и в 6,25% - гарднереллы, бактероиды, стоматококки, микрококки и нейссерии.

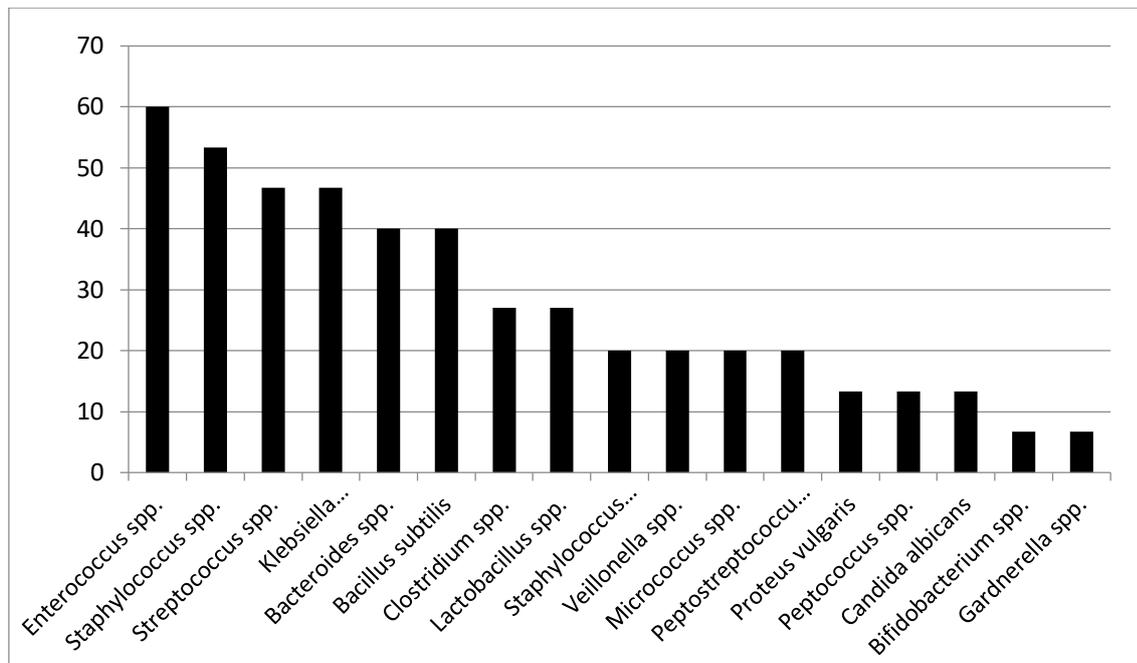


Рис. 1.

Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у 1 группы здоровых беременных женщин.

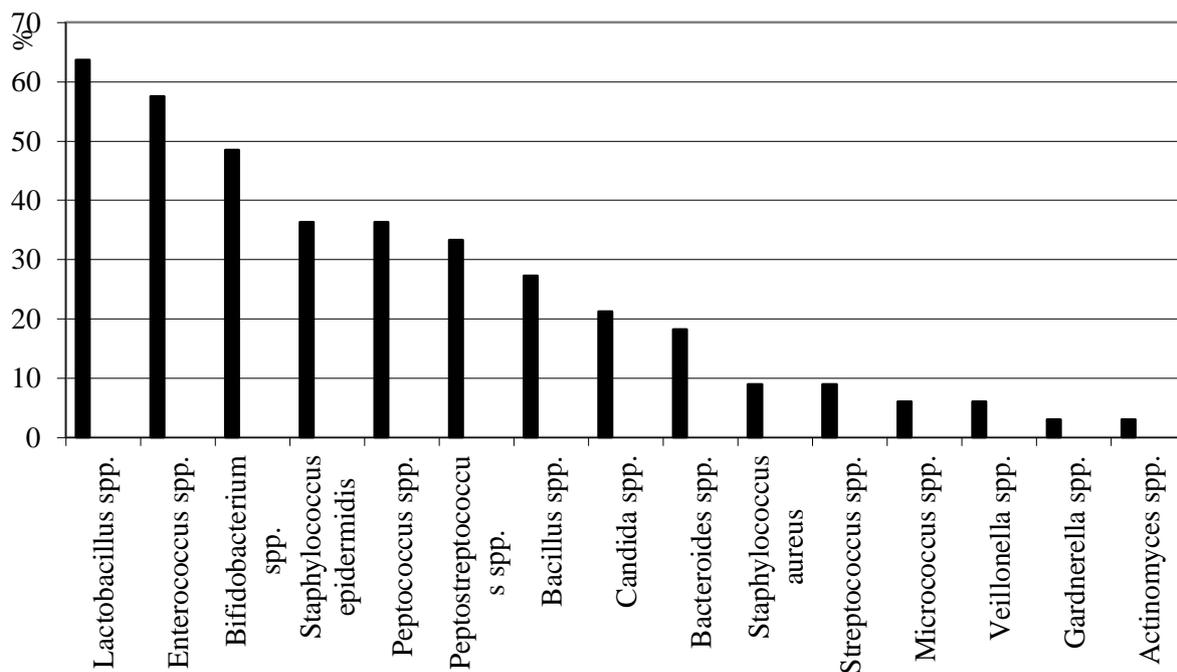


Рис. 2. Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у 2-й группы здоровых небеременных женщин.

В количестве более $4 \lg \text{ КОЕ/см}^2$ (от 4,0 до 5,17) выделялись стрептококки, нейссерии, пептококки, пептострептококки, бифидобактерии, клостридии, вейлонеллы, бактероиды, стрептобациллы, гарднереллы, актиномицеты. В количестве ниже $4 \lg \text{ КОЕ/см}^2$ (от 1,47 до 3,97) высевались энтерококки, микрококки, золотистый и эпидермальный стафилококки, стоматококки, лактобациллы, клебсиеллы, кишечная палочка, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*.

В 4-й группе небеременных с ПНБ (рис. 4) энтерококки встречались у 60% женщин, в 40% - стрептобациллы и *Bacillus subtilis*, в 26,7% - эпидермальный стафилококк и *Klebsiella pneumoniae*, в 20% - пептострептококки, в 13,3% - кишечная палочка и вейлонеллы и в 6,7% - золотистый стафилококк, стоматококки, протей, клостридии, бактероиды, гарднереллы и лактобациллы.

В количестве более $4 \lg \text{КОЕ/см}^2$ (от 4,02 до 6,95) выделялись *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, пептококки, пептострептококки, клостридии, вейлонеллы, стрептобациллы и гарднереллы. В количестве ниже $4 \lg \text{КОЕ/см}^2$ (от 2,63 до 3,83) высевались эпидермальный стафилококк, микрококки, энтерококки, стоматококки, бактероиды, кандиды, бациллы и лактобациллы.

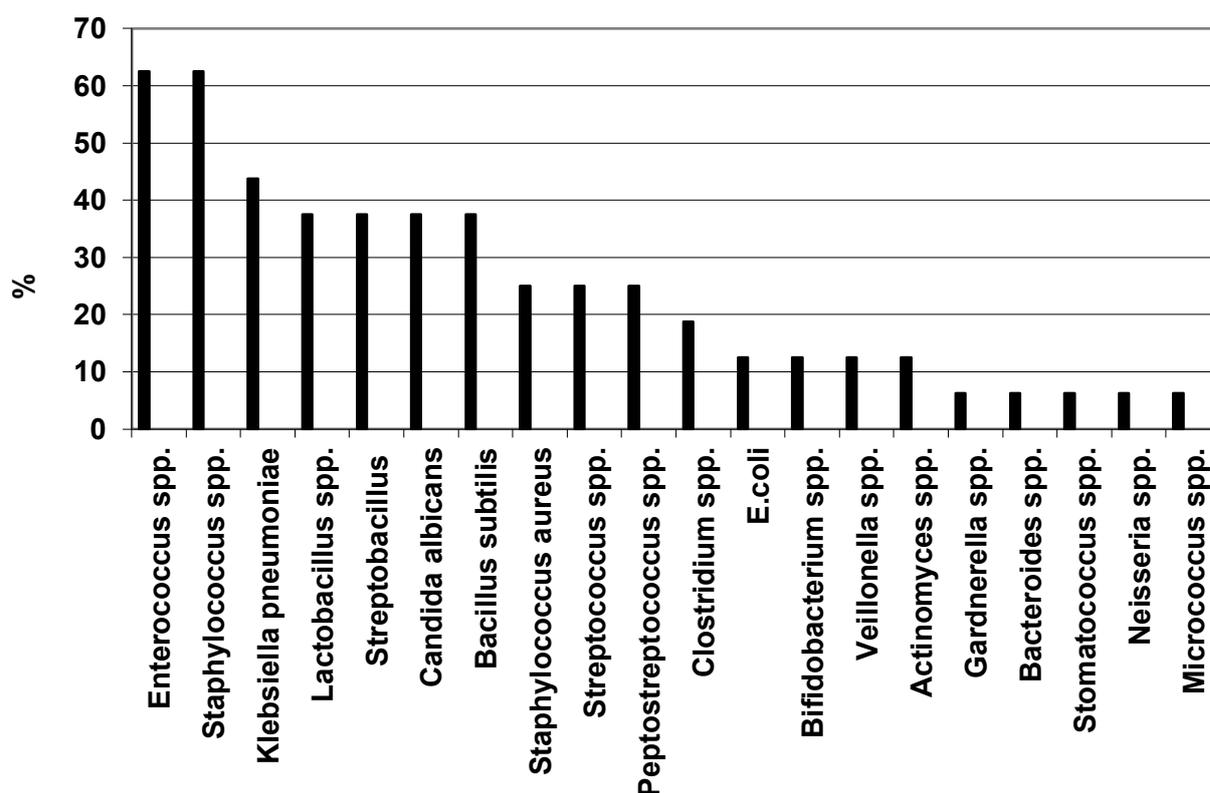


Рис. 3. Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у женщин 3-й группы беременных с ПНБ.

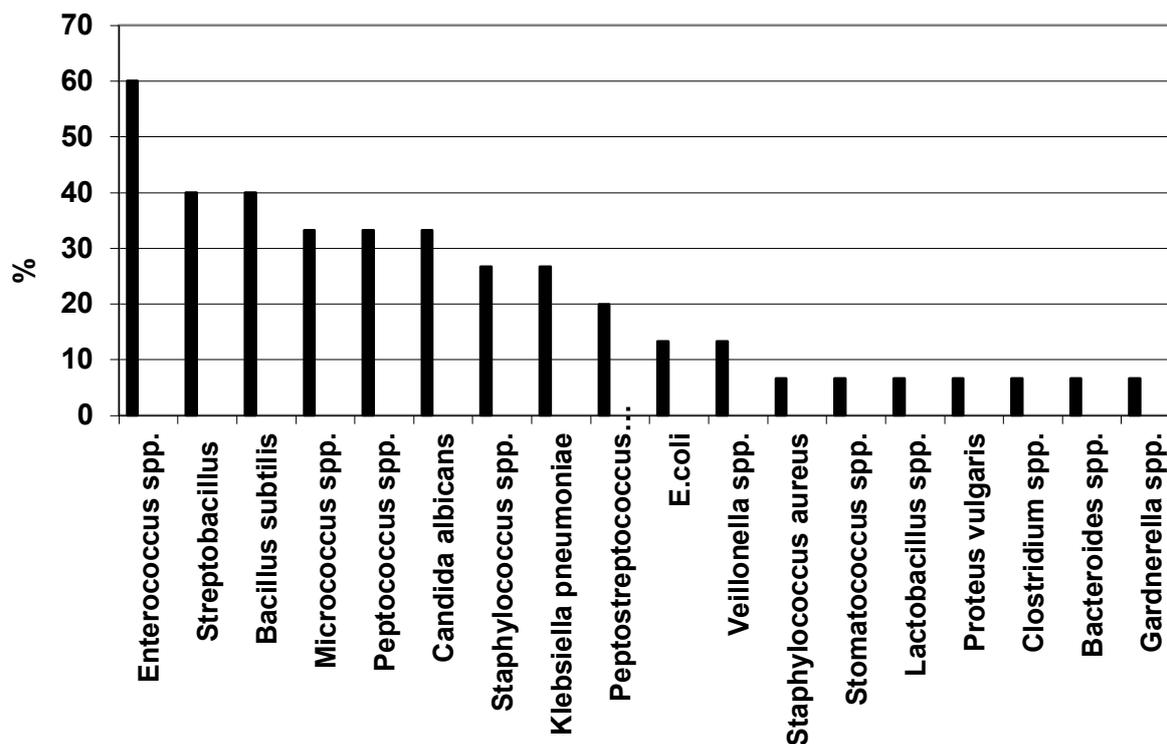


Рис. 4. Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у женщин 4-й группы небеременных с ПНБ.

В результате исследования продукции газовых сигнальных молекул установлено, что микроорганизмы рода *Candida*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* и семейства *Enterobacteriaceae* в исследуемых группах женщин с невынашиванием беременности в большем количестве ($p < 0,05$) потребляют NO, что, учитывая функции последнего, свидетельствует о поддержании воспалительного процесса, нарушении передачи нервных импульсов в ЦНС. Исключение составляют бактерии рода *Lactobacillus*, выделенные как от беременных, так и у небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности, которые вырабатывают NO в сотни раз больше по сравнению с другими микроорганизмами, но в 10 раз меньше по сравнению со здоровой группой (рис.5).

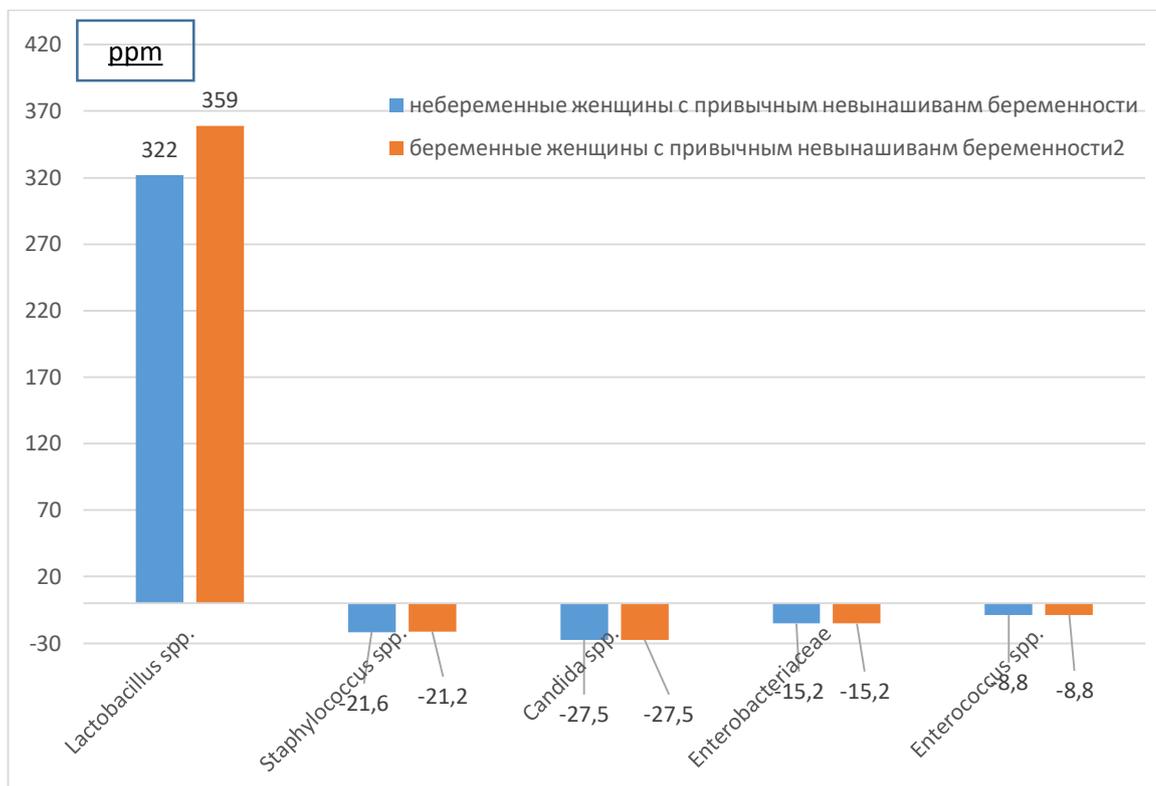


Рисунок 5. Продукция NO микроорганизмами, выделенными из влагалища небеременных и беременных женщин с привычным невынашиванием беременности

Все микроорганизмы, выделенные от пациенток с привычным невынашиванием беременности вырабатывают оксид углерода, концентрация которого немного превышала таковую по сравнению со здоровыми женщинами, что указывает на то, что СО не может в полном объеме выполнять свои защитные функции. Что касается СО, продуцируемого лактобациллами от женщин с ПНБ, то его концентрация в 10 раз превышает таковую у других микроорганизмов, и в 2 раза больше концентрации СО от здоровой группы (рис.6).

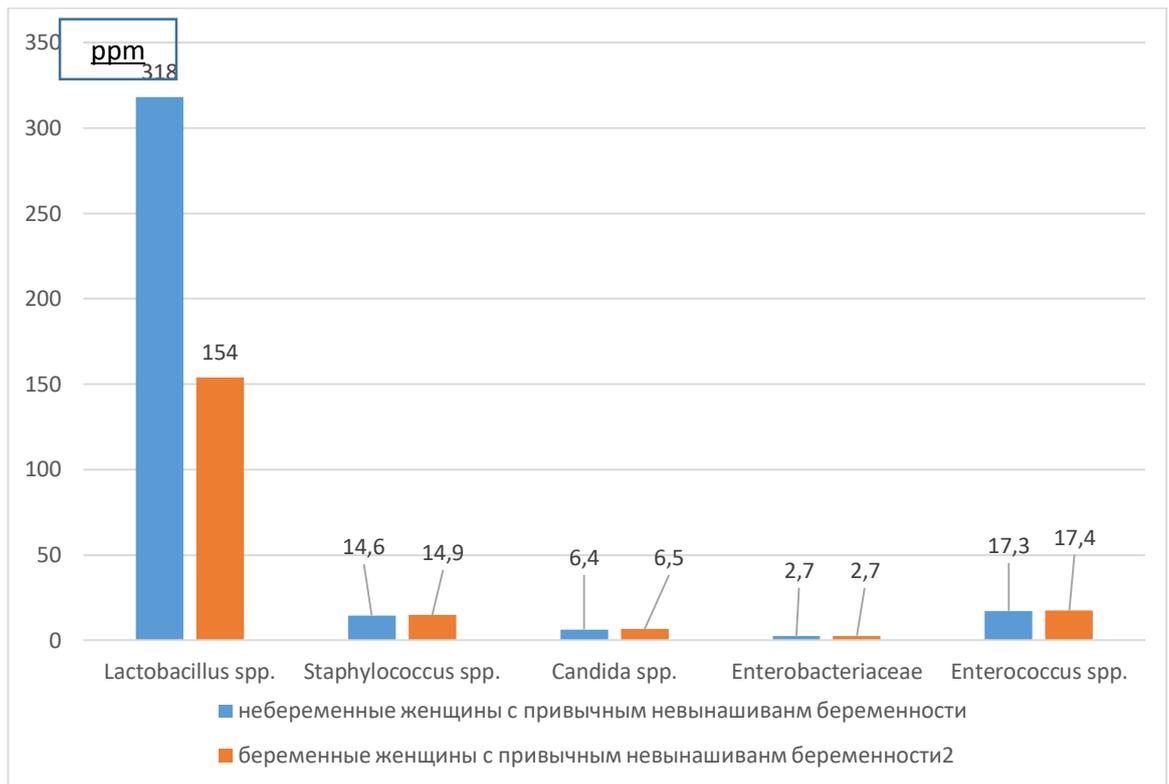


Рисунок 6. Продукция CO микроорганизмами, выделенными из влагалища небеременных и беременных женщин с привычным невынашиванием беременности

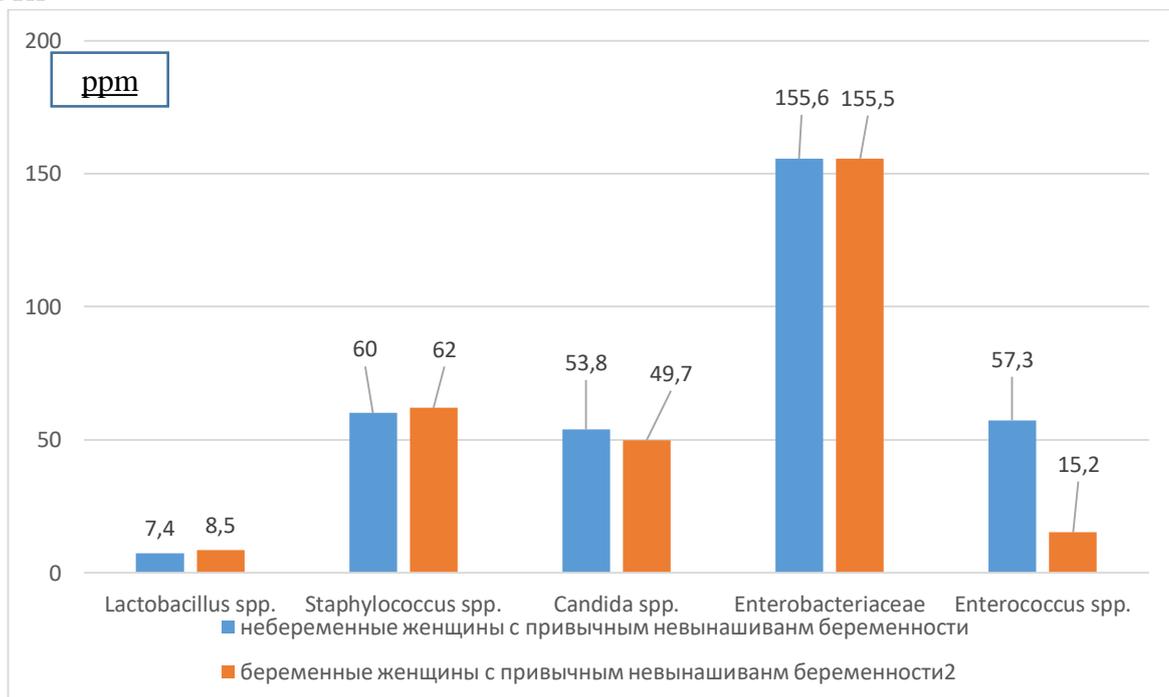


Рисунок 7. Продукция H₂S микроорганизмами, выделенными из влагалища небеременных и беременных женщин с привычным невынашиванием беременности

Все микроорганизмы, выделенные от пациенток с привычным невынашиванием беременности вырабатывают сероводород, концентрация которого в несколько раз и даже десятков раз больше по сравнению со здоровыми женщинами, что указывает на то, что данный газ не может в полном объеме выпол-

нять свои защитные функции. Самую высокую концентрацию H_2S продуцировали микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae по сравнению с другими (рис.7).

Выводы:

Таким образом, во влагалище женщин всех групп доминирующая микрофлора - не лактобациллы, а энтерококки, которые встречаются в 60% случаев и более. Лактобациллы выявлялись у 27-60% у здоровых пациенток 1-й и 2-й групп и их количество не более $4 \lg$ КОЕ/см². У небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности (4-я группа) лактобациллы почти не встречались. Только у 6,7% они выявлялись в незначительном количестве $2,77 \lg$ КОЕ/см². У беременных женщин с ПНБ (3-я группа) лактобациллы выделялись уже в 37,5% случаев и их количество увеличивалось в среднем до $3,8 \lg$ КОЕ/см².

Микробиота влагалища беременных и небеременных женщин в остальном представлены факультативными условно-патогенными бактериями: эпидермальными стафилококками, стрептококками, бациллами, стрептобациллами, клебсиеллами, кандидами и др.

Установлены дисбиотические нарушения микробиома влагалища как у беременных, так и у небеременных женщин, причем в большей степени выраженности у пациенток с привычным невынашиванием беременности. На фоне уменьшения встречаемости лактобацилл, которые должны обеспечивать регуляторную функцию различных сторон жизнедеятельности организма женщин, условно-патогенные бактерии своими метаболитами могут играть отрицательную роль, не только поддерживая воспалительные процессы во влагалище, но и оказывать негативное воздействие на плод.

Выявленные дисбиотические нарушения микробиома влагалища у пациенток с привычным невынашиванием беременности, сопровождаются изменениями выделения и поглощения газовых сигнальных молекул (NO , H_2S и CO). Все изученные микроорганизмы влагалища в группах женщин с невынашиванием беременности в большем количестве ($p < 0,05$) потребляют NO , за исключением лактобацилл, которые этот газ выделяют (от 322 до 356 ppm). Вагинальная микробиота у беременных и небеременных женщин с ПНБ продуцирует оксид углерода в небольшой концентрации (от 2 до 17 ppm), за исключением лактобацилл, которые выделяют данный газ в большем количестве, но не превышающем физиологическую норму (от 154 до 318 ppm). В вышеуказанных группах женщин микроорганизмы влагалища выделяют достаточно высокую концентрацию H_2S (от 15 до 155 ppm), за исключением лактобацилл, у которых количество данного газа не более 8 ppm. Вероятно данные газовые сигнальные молекулы оказывают влияние на воспалительные процессы генитального тракта у обследуемого контингента женщин.

Литература:

1. Анкирская, А.С. Бактериальный вагиноз / А.С. Анкирская // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 3. — С. 10–13.;

2. Гинцбург, А.Л. Ильина Т.С., Романова Ю.М. “Quorum sensing” или социальная жизнь бактерий .Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол. — 2003. — № 5. — С. 86–93
3. Кира Е.Ф., Берлев И.В., Молчанов О.Л. Особенности течения беременности, родов и послеродового периода у женщин с дисбиотическими нарушениями влагалища. Журнал акушерства и женских болезней. —1999. – Вып. 2. — Т. XLVII. — С. 8–11.
4. Плотко, Е.Э.Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? /Е.Э. Плотко, А.Е. Донников,Е.С. Ворошилина, Л.В. Хаятин, Л.В. Тумбинская //Акушерство и гинекология. — 2011. — № 1. — С. 66–70.
5. Савицкая, К.И.Нормальная микрофлора генитального тракта здоровых женщин репродуктивного возраста / К.И. Савицкая,А.А. Воробьев, В.А. Молочков, Н.В. Зур // Вестн. Рос.АМН. — 2003. — № 9. — С. 48–52
6. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Монография Тверь, 2016, ред.-изд. Центр Твер.гос.мед.ун-та, 214 с.:ил
7. Янковский, Д.С. Дымент Г.С. Улучшение репродуктивного здоровья женщины путем оптимизации микроэкологии пищеварительного и уrogenитального тракта .Репродукт. здоровье женщины. — 2007. — № 3. —С. 148–154
8. Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Shenderov B.A. Vaginal microbiota in healthy women and patients with bacterial vaginosis and nonspecific vag-initis Microbial Ecology in Health and Disease. 2006; 18: 71-74
9. Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. “Quorum sensing in bacteria: the LuxR – LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.” J Bacteriol, 176(2) (1994): 269–275 7.
10. L. Li, P.K. Moore. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. Biochemical Society Transactions. — Great Britain, Nov 2007. — Т. 35, № Pt 5: 1138–1141.
11. Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C.,Islam, M.R., Forney, L.J.“Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods.”Microbiology, 150(2004): 2565–2573