

ОСОБЕННОСТИ БИОТЫ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

М.Н. БОЛДЫРЕВА, Е.В. ЛИПОВА, Д.Ю. ТРОФИМОВ, Ю.Г. ВИТВИЦКАЯ, И.А. ГУСЬКОВА

Particular characteristics of the urogenital tract biota in healthy women of child-bearing potential in real-time PCR studies

M.N. BOLDYREVA, YE.V. LIPOVA, D.YU. TROFIMOV, YU.G. VITVITSKAYA, A. GUSKOVA

Об авторах:

М.Н. Болдырева — ведущий научный сотрудник отдела иммуногенетики, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, д.м.н.

Е.В. Липова — заведующая курсом лабораторной диагностики и лабораторной микологии при кафедре дерматовенерологии и клинической микологии ГОУ ДПО РМАПО, д.м.н., профессор

Д.Ю. Трофимов — заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов ФГУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова Росмедтехнологий», к.б.н.

Ю.Г. Витвицкая — аспирант курса лабораторной диагностики и лабораторной микологии при кафедре дерматовенерологии и клинической микологии ГОУ ДПО РМАПО

И.А. Гуськова — научный сотрудник отдела иммуногенетики, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, к.б.н.

Методом ПЦР в режиме реального времени исследованы количественные характеристики нормальной и условно-патогенной аэробной/факультативно анаэробной, анаэробной биоты, микоплазм и грибов рода кандиды в уретре, цервикальном канале и влагалище здоровых женщин в возрасте 18—45 лет. Установлено отсутствие различий между биотопами по бактериальному спектру и относительному (относительно *Lactobacillus* spp.) количеству как аэробных, так и анаэробных бактерий. У всех женщин моложе 40 лет и части женщин старше 40 лет биота была представлена преимущественно лактобациллами. У части женщин старше 40 лет микробный состав биоценоза характеризовался снижением количества лактобацилл и замещением их анаэробными микроорганизмами/группами микроорганизмов, главным образом такими, как *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* spp. и *Eubacterium* spp. Изменение микробного состава биоты уrogenитального тракта может служить маркером гипо-эстрогении.

Ключевые слова: ПЦР в режиме реального времени, биота, уrogenитальный тракт, репродуктивный возраст.

The PCR method in the real-time mode helped to analyze the quantitative characteristics of the normal and conditionally pathogenic aerobic/optionally anaerobic, anaerobic biota, mycoplasmas and *Candida* fungi in the urethra, cervical channel and vagina in healthy women aged 18-45. The analysis revealed absence of any differences between the biotopes by the bacterial spectrum and quantity of both aerobic and anaerobic bacteria with regard to *Lactobacillus* spp. The biota of all of the women who were younger than 40 and some of the women who were older than 40 had mostly lactobacilli. The microbial composition of the biocenosis in some women older than 40 is characterized by the reduction in the quantity of lactobacilli and their replacement with anaerobic microorganisms/groups of microorganisms, mainly such as *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* spp. and *Eubacterium* spp. Any change in the microbial composition of the urogenital tract biota can serve as a marker of hypoestrogenia.

Key words: real-time PCR, biota, urogenital tract, child-bearing potential.

Введение

В настоящее время инфекционно-воспалительные заболевания уrogenитального тракта занимают лидирующие позиции в структуре акушерско-гинекологической патологии. Среди них характер-

но преобладание малосимптомных и бессимптомных форм заболеваний, в том числе обусловленных условно-патогенной биотой [1, 2]. Бессимптомное течение такого рода заболеваний может приводить к позднему обращению за медицинской помощью и развитию вследствие этого серьезных осложнений, стать причиной нарушения репродуктивной функции [3]. В то же время у части женщин репродуктивного возраста старше 40 лет уже могут начаться физиологические изменения микробного

состава биоты урогенитального тракта, связанные с переходом к менопаузе.

В связи с этим целью настоящего исследования стало выявление особенностей состава биоты урогенитального тракта здоровых женщин с регулярной менструальной функцией моложе и старше 40 лет.

Материал и методы исследования

Из 36 женщин, обратившихся в ГУЗ СВАО КВД № 19 г. Москвы с целью профилактического осмотра, была отобрана 21 женщина с регулярной менструальной функцией, не имевшая субъективных и/или объективных симптомов инфекционно-воспалительного процесса урогенитального тракта. Критериями исключения служили: 1) возраст менее 18 лет и более 45 лет; 2) сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С; 3) беременность или лактация; 4) соматические заболевания в стадии декомпенсации; 5) эндокринопатии; 6) онкологические заболевания; 7) системное применение гормональных контрацептивных средств и внутриматочной контрацепции; 8) применение системных антибактериальных препаратов в течение 2 месяцев, предшествовавших обследованию; 9) использование местнодействующих лекарственных средств (per vaginae) в течение 3 недель, предшествовавших обследованию.

Женщины в зависимости от возраста были разделены на две группы: 1-я — моложе 40 лет и 2-я — старше 40 лет. Средний возраст женщин 1-й группы составил $29,7 \pm 5,9$ года ($n = 14$), средний возраст женщин 2-й группы составил $43,7 \pm 2,4$ года ($n = 7$).

Методы исследования

Количественную оценку биоты в соскобах из трех биотопов (вагина, цервикс, уретра) выполняли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе ДТ-96 (НПО «ДНК-Технология») с помощью набора реагентов «Фемофлор» (НПО «ДНК-Технология», г. Москва), позволяющего определить такие показатели, как контроль взятия материала, общая бактериальная масса, а также следующие микроорганизмы/группы микроорганизмов: *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*, *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida spp.*

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи стандартного пакета программ «Статистика».

Результаты исследования и обсуждение

Согласно данным многочисленных исследований [4, 5] установлено, что главной составляющей

нормобиоты урогенитального тракта женщин репродуктивного возраста, обеспечивающей колонизационную резистентность, являются представители рода *Lactobacillus*. Результаты количественного определения этих микроорганизмов в трех отделах урогенитального тракта в двух группах женщин репродуктивного возраста представлены на рис. 1.

У женщин моложе 40 лет (1-я группа) средний показатель абсолютных значений в виде Lg_{10} количества лактобацилл составил $5,9 \pm 1,0$ в уретре (U1), $6,1 \pm 1,0$ в цервикальном канале (C1) и $6,8 \pm 0,8$ во влагалище (V1). Количество лактобацилл в уретре и цервикальном канале было практически одинаковым (около 10⁶), а количество лактобацилл во влагалище — на порядок выше (около 10⁷). Вероятно, это связано с тем, что многослойный плоский неороговевающий эпителий, богатый гликогеном и являющийся главным источником питания для лактобацилл, в отличие от влагалища, покрывает уретру и цервикальный канал (экзоцервикс) лишь частично. У женщин старше 40 лет количество лактобацилл составило в среднем $4,6 \pm 2,4$ в уретре (U2), $4,2 \pm 2,4$ — в цервикальном канале (C2) и $5,5 \pm 2,1$ — во влагалище (V2). Среднее количество лактобацилл в уретре и цервикальном канале достоверно не различалось, а среднее количество лактобацилл во влагалище было на порядок выше, чем в уретре и цервикальном канале. Обращает на себя внимание значительно более выраженный разброс показателей количества лактобацилл у женщин старше 40 лет по сравнению с женщинами моложе 40 лет во всех исследованных биотопах. Средние значения количества лактобацилл у женщин старше 40 лет в каждом исследовании были приблизительно на порядок ниже, чем у женщин моложе 40 лет.

Следует отметить, что абсолютные количественные показатели ПЦР в режиме реального времени находятся в прямой зависимости от техники взятия биоматериала, поэтому для анализа были использованы также и относительные количественные показатели. Относительное количество лактобацилл определяли по разнице абсолютных количеств лактобацилл и общей бактериальной массы в виде Lg_{10} . Средние относительные значения лактобацилл в двух группах женщин представлены на рис. 2.

Данные, представленные на рис. 2, демонстрируют, что у женщин моложе 40 лет (группа 1) уровень лактобацилл в трех биотопах практически не отличался от уровня общей бактериальной массы, то есть лактобациллы у них были главной составляющей биоценоза.

У женщин старше 40 лет в образцах, полученных из различных отделов мочеполовой системы, наблюдалось снижение количества лактобацилл относительно общей бактериальной массы. Обращает на себя внимание значительный разброс показателей уровня лактобацилл у женщин старше 40 лет. Это связано с тем, что лишь у 43% женщин

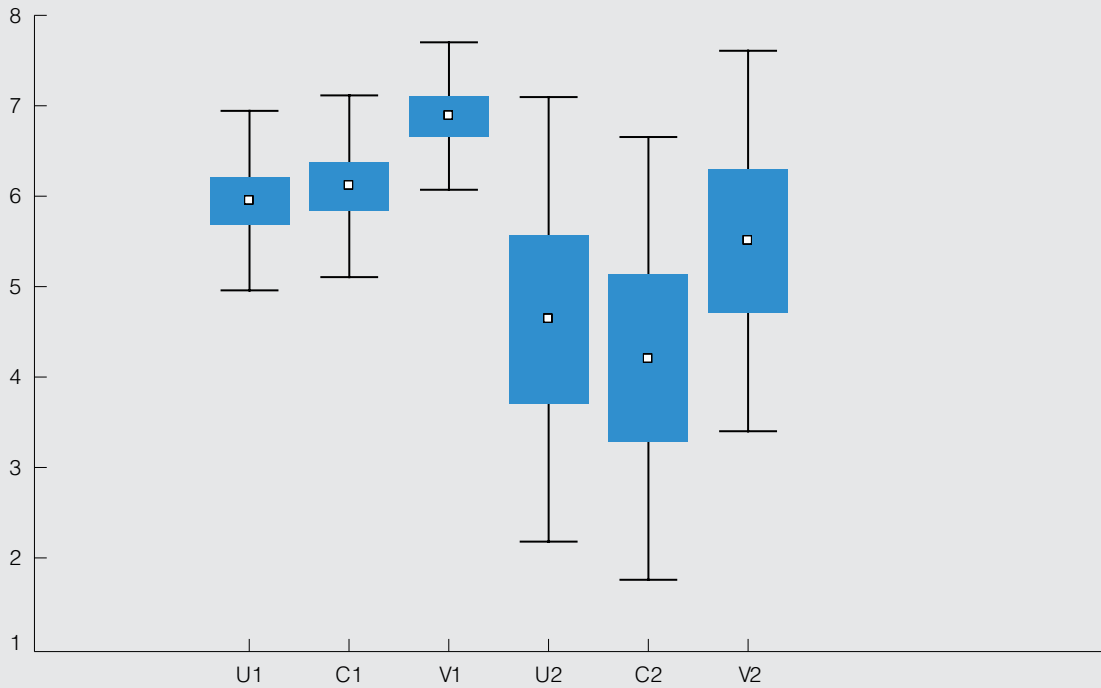


Рис. 1. Средние значения абсолютного количества (Lg_{10}) *Lactobacillus* spp. в трех биотопах здоровых женщин репродуктивного возраста (U-uretra, C-cervix, V-vagina) в двух группах: 1-я группа — моложе 40 лет и 2-я группа — старше 40 лет. Указаны стандартные ошибки и стандартные отклонения

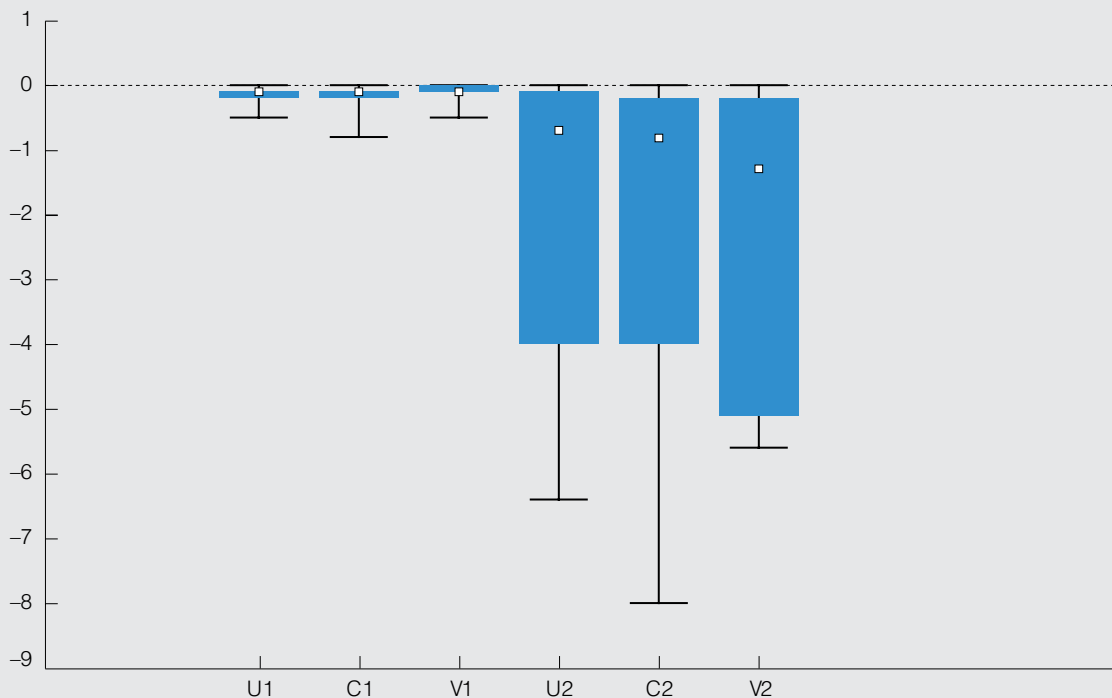


Рис. 2. Средние значения относительного количества (Lg_{10}) *Lactobacillus* spp. в трех биотопах здоровых женщин репродуктивного возраста (U-uretra, C-cervix, V-vagina) в двух группах: 1-я группа — моложе 40 лет и 2-я группа — старше 40 лет. Указаны также минимальные и максимальные значения

из этой группы лактобациллы были главной составляющей урогенитального биоценоза, в отличие от женщин моложе 40 лет, у которых лактобациллы почти в 100% случаев были главными представителями биоты во всех исследованиях. Таким образом, почти у половины обследованных здоровых женщин старше 40 лет обнаружено заметное снижение уровня лактобацилл. Снижение преимущественной колонизации лактобациллами фертильных женщин старше 40 лет до 68,3% по сравнению со 100% колонизацией лактобациллами молодых женщин было установлено также Cauci S. и соавт. [6].

Снижение количества лактобацилл у части фертильных женщин старше 40 лет имело место на фоне неизменного уровня общей микробной обсемененности урогенитального тракта, о чем свидетельствует отсутствие различий средних значений общей бактериальной массы между женщинами моложе и старше 40 лет во всех исследованиях.

Таким образом, у здоровых фертильных женщин после 40 лет на фоне отсутствия атрофических изменений, о чем свидетельствуют данные клинического осмотра, и отсутствия снижения уровня общей микробной массы биота меняется в сторону снижения уровня лактобацилл и замещения их другими микроорганизмами.

Какие микроорганизмы замещают лактобациллы у здоровых женщин старше 40 лет? Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии различий между двумя группами женщин по содержанию микоплазм и грибов рода *Candida*, что говорит о том, что не эти микроорганизмы замещают лактобациллы в биоценозе части женщин старше 40 лет.

Учитывая, что почти у половины женщин после 40 лет отмечалось снижение количества лактоба-

цилл, женщины старше 40 лет были разделены соответственно на 2 подгруппы: 2a — с сохраненным уровнем лактобацилл и 2b — со сниженным уровнем лактобацилл. Количество условно-патогенных бактерий (аэробных и анаэробных) рассчитывали относительно уровня лактобацилл. Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что у женщин как моложе (группа 1), так и старше 40 лет с преимущественно лактобациллярной биотой (группа 2a) суммарное количество как аэробных, так и анаэробных условно-патогенных бактерий было существенно ниже, чем количество лактобацилл, и не различалось между обеими группами. Средний уровень условно-патогенных бактерий был приблизительно на четыре порядка ниже, чем лактобацилл (в 10 тысяч раз). У женщин старше 40 лет со сниженным количеством лактобацилл (группа 2b) количество анаэробных бактерий превышало количество лактобацилл в среднем на порядок (в 10 раз) в уретре и влагалище и на два порядка (в 100 раз) — в цервикальном канале. Средние значения относительного количества анаэробных бактерий в исследованных биотопах у женщин моложе 40 лет и женщин старше 40 лет со сниженным количеством лактобацилл достоверно различались и составляли соответственно $-3,6 \pm 2,0$ и $+1,1 \pm 3,0$ ($p < 0,001$) в уретре, $-4,2 \pm 1,7$ и $+2,0 \pm 2,8$ ($p < 0,001$) в цервикальном канале, $-3,9 \pm 1,5$ и $+1,1 \pm 2,0$ ($p < 0,001$) во влагалище.

Уровень аэробных (факультативно-анаэробных) бактерий во всех группах обследованных женщин, в отличие от анаэробных, не превышал уровень лактобацилл (рис. 3b). Однако у женщин старше 40 лет со сниженным количеством лактобацилл уровень аэробных бактерий во всех исследованиях был вы-

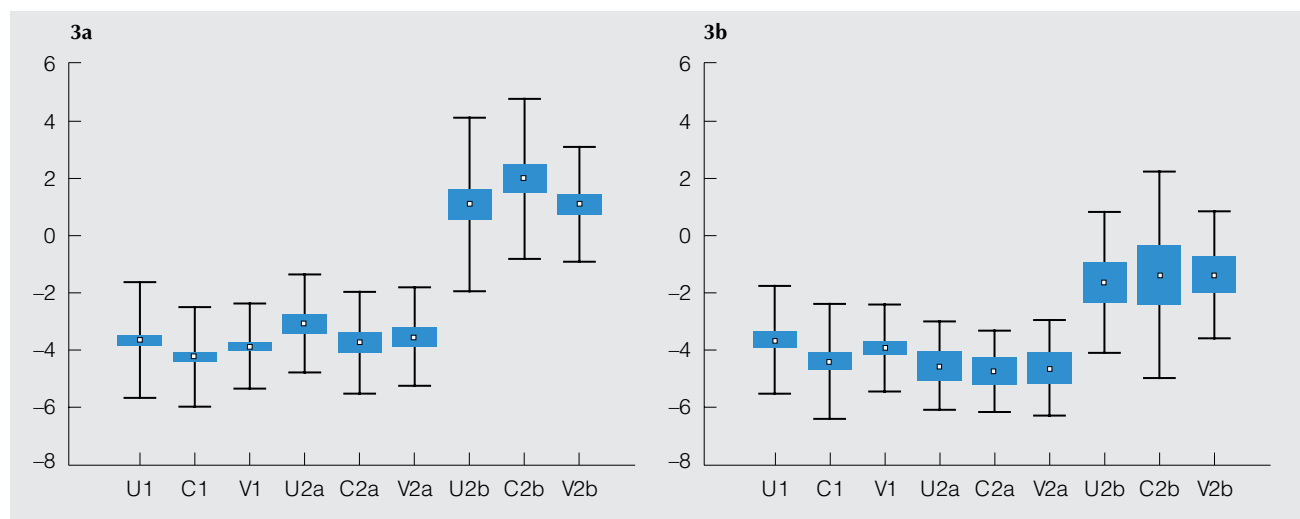


Рис. 3. Средние значения относительного суммарного количества (Lg_{10}) анаэробных (3a) и аэробных (3b) бактерий в трех группах женщин — 1 (моложе 40 лет), 2a (старше 40 лет с преимущественно лактобациллярной биотой), 2b (старше 40 лет со сниженным уровнем лактобацилл) в трех биотопах (U-uretra, C-cervix, V-vagina). Указаны средние значения, стандартные ошибки и стандартные отклонения

ше, чем у женщин моложе 40 лет, и составлял соответственно $-1,6 \pm 2,5$ и $-3,6 \pm 1,9$ ($p < 0,01$) в уретре, $-1,3 \pm 3,6$ и $-4,4 \pm 2,0$ ($p < 0,001$) в цервикальном канале, $-1,3 \pm 2,2$ и $-3,9 \pm 1,5$ ($p < 0,001$) во влагалище. Таким образом, у части женщин старше 40 лет лактобациллы замещаются преимущественно анаэробной бактериальной флорой, хотя количество аэробной (факультативно анаэробной) микрофлоры у этих женщин также увеличивается, но не так значительно, как анаэробной.

Какие анаэробные бактерии/группы бактерий играют ведущую роль в физиологической перестройке микробного спектра в начальный период гормональных перестроек? Оказалось, что наибольшее значение среди анаэробных бактерий в качестве претендентов для замещения лактобацилл у женщин старше 40 лет имели *Atopobium vaginae*, *Megasphaera spp./ Veillonella spp. / Dialister spp.*, *Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp.* и *Eubacterium spp.* (рис. 4). Увеличение количества всех других исследованных анаэробных бактерий было выражено несколько меньше, хотя различия с женщинами моложе 40 лет были достоверными.

По данным проспективных эпидемиологических исследований, средний возраст начала перехода в состояние менопаузы соответствует 45,5—47,5 года [7,8], однако популяционные данные указывают на то, что естественная репродуктивная способность обычно заканчивается в возрасте 39—41 года, а интервал между окончанием фертильности и наступлением менопаузы составляет приблизительно 8—10 лет. [9]. В период пременопаузы происходит постепенное снижение уровня эстрогенов, впоследствии переходящее в резкий дефицит их в периферической крови [10]. Дефицит эстрогенов приводит к прекращению пролиферативных процессов во влагалище, вследствие чего исчезает гликоген, а из влагалищного биоценоза частично или полностью (в зависимости от степени эстрогенного дефицита и возрастных метаболических нарушений) элиминируется основной компонент биоты — лактобациллы [11]. Клинически в период перехода к менопаузе выделяют четыре типа менструальных циклов [12], в том числе регулярные. В настоящем исследовании приблизительно у половины обследованных здоровых женщин старше 40 лет состав урогенитального биоценоза не отличался от биоценоза женщин моложе 40 лет. У другой половины женщин старше 40 лет было обнаружено снижение количества лактобацилл и замещение их на анаэробные бактерии. Можно предположить, что у этих женщин на фоне сохранившейся регулярности менструального цикла уже могла начаться гормональная перестройка в тканях урогенитального тракта, повлекшая за собой изменение характеристик многослойного плоского неорогове-

вающего эпителия, что вызвало физиологические изменения биоты в виде замещения лактобацилл на анаэробные бактерии.

Изменение состава биоты урогенитального тракта может оказаться чувствительной реакцией на гормональные изменения в тканях, а количественное исследование биоты методом ПЦР в реальном времени — новым чувствительным методом диагностики как физиологических, так и патологических изменений.

Выводы

1. Качественный и относительный количественный микробный состав биоценозов уретры, цервикального канала и влагалища у здоровых фертильных женщин практически аналогичен.

2. У здоровых женщин с регулярным менструальным циклом моложе 40 лет и у части женщин старше 40 лет лактобациллы являются основными представителями биоты урогенитального тракта.

3. У здоровых женщин с регулярным менструальным циклом старше 40 лет маркером физиологической гипоестрогении может служить изменение микробного состава урогенитального биоценоза, заключающееся в уменьшении количества лактобацилл и замещении их анаэробными микроорганизмами / группами микроорганизмов, преимущественно *Atopobium vaginae*, *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*, *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.* и *Eubacterium spp.*

Литература

1. Кубанова А.А., Аковбян В.А., Федоров С.М. и др. Состояние проблемы бактериального вагиноза. Вестник дерматологии и венерологии. 1996; 3:22—26.
2. Klebanoff M.A., Schwebke J.R., Zhang J. et al. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstetric Gynecology*. 2004; 104: 267—272.
3. Hager W.D., McDaniel P.S. Treatment of serious obstetric and gynecologic infections with cefoxitin. *Journal of Reproduction Medicine*. 1983; 28(5): 337—340.
4. Spiegel C.A. Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991; 4(4): 485—502.
5. Larsen B, Monif G.R.G. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clinical Infections Diseases*. 2001; 32:e69—77.
6. Cauci S., Driussi S., De Santo D. et al. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Vaginal Flora Changes in Peri- and Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(6): 2147—2152.
7. Li S., Lanuza D., Gulanick M., Penckofer S. et al. Perimenopause: the transition into menopause. *Health Care Women Int* 1996; 17(4): 293—306.
8. Mc Kinlay S.M. Menopause. *Maturitas* 1992; 14:103—115.
9. Frank O., Bianchi P.G., Campana A.J. The end of fertility: age, fecundity and fecundability in women. *Biosocial Sciences*. 1994; 26(3): 349—368.
10. Прилепская В.Н., Царева Н.В. Менопауза: возможности заместительной гормонотерапии. *Русский медицинский журнал*. 1998; 8:501—504.
11. Forsberg J.G. A morphologists approach to the vagina — age-related changes and estrogen sensitivity. *Maturitas*. 1995; 22(Suppl.22): 7—15.
12. Сметник В.П., Кулаков В.И. Руководство по климактерию. Москва: Медицинское информационное агентство. 2001.