

РОЛЬ ВАГИНАЛЬНОГО МИКРОБИОМА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ.

Досова С.Ю.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет
Минздрава России

THE ROLE OF THE VAGINAL MICROBIOME IN THE PATHOGENESIS OF HABITUAL MISCARRIAGE

Dosova S.Y.

Tver State Medical University

*Аннотация: Проблема невынашивания беременности не теряет своей актуальности в настоящее время. Частота данной патологии по оценкам различных авторов составляет от 2 до 5 % в общей популяции. Как известно, инфекционный фактор играет весьма значимую роль в генезе привычного невынашивания. Вопрос об этиологической роли инфекции в привычном невынашивании широко дискутируется в литературе. В связи с этим проведен анализ микробиома влагалища здоровых женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности, а также спектра выделяемых лактобациллами газовых сигнальных молекул, играющих важную роль в поддержании здоровой жизнедеятельности организма. Забор материала из влагалища производили 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 питательные среды: Эндо агар для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, микрококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера и тд. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Количество колоний выражали в lg КОЕ/мл. Продукцию газовых сигнальных молекул (H₂, O₂, N₂, CO, CH₄, CO₂, NO, H₂S) определяли с помощью метода газовой хроматографии на приборе Хроматэккристиалл 5000.2. Количество выделенных газов измеряли в ppm. Спектр основного микробиома влагалища здоровых женщин в возрасте 19-23 лет представлен бактериями нормальной микрофлоры родов *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* (эпидермальные штаммы). Условно-патогенные грибы рода *Candida*, бактероиды, золотистый стафилококк, стрептококки, микрококки, вейлонеллы, гарднереллы и актиномицеты выделялись в редких случаях. Различные штаммы лакто-бацилл выделялась у 91% здоровых женщин. Среди газовых молекул, продуцируемых лактобациллами, преобладают: CO₂, CO и NO. Установлены дисбиотические нарушения микробиома влагалища у небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе. Также у данной группы пациенток отмечено снижение продукции газовых сигнальных молекул: CO и NO, и повышение продукции H₂S и CH₄. Полученные*

результаты свидетельствуют о угнетении иммунного ответа у данной категории больных и необходимости коррекции дисбиотических нарушений еще на эта-не прегравидарной подготовки.

Ключевые слова: вагинальный микробиом, газовые сигнальные молекулы, лактобациллы

Resume.

Problem of habitual miscarriage is very important in our modern life. The frequency of this pathology is about 2 - 5 %. Infectious factor plays a very important role in genesis of habit-ual miscarriage. The question about etiology of infection is widely discussed in literature. This article is devoted to the study of vaginal microbiome of healthy women and women with habitual miscarriage as well as to the study of the spectrum of gas signal molecules re-leased by them, which play important role in maintaining a healthy body. The sample of the material from the vagina was taken with a sterile swab on a polystyrene stick with an area of 1 cm² and within 2 hours was delivered to the bacteriological laboratory. To isolate facultatively anaerobic and aerobic bacteria, nutrient media were used: Endo agar for enterobacteria, mannitol-salt agar (M118) for staphylococci, micrococci, for detection of lecithinase activity – Baird-Parker agar, etc. Cultivation was carried out at a temperature of 37°C for 24-48 hours. The number of colonies was expressed in lg CFU / ml. the Production of gas signaling molecules (H₂, O₂, N₂, CO, CH₄, CO₂, NO, H₂S) was determined using the gas chromatography method on the Chromatek-crystal 5000.2 instrument. The amount of gases was measured in ppm. The spectrum of the main vaginal microbiome of healthy women (19-23 years) is represented by bacteria of the normal microbiota of the genera Lactobacillus, Enterococcus, Bifidobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bacillus, Staphylococcus (epidermal strains). Opportunistic fungi of the genus Candida, Bacteroides, Staphylococcus aureus, Streptococci, Micrococci, Weylonella, Gardnerella and Actinomycetes were isolated in rare cases. Different strains of lactobacilli were isolated in 91% of healthy women. Lactobacilli produced the most of all the next gas molecules: CO₂, CO and NO. Dysbiotic disorders of the vaginal microbiome in non-pregnant women with a history of habitual miscarriage have been established. Also a decrease in the production of gas signaling molecules: CO and NO, and an increase in the production of H₂S and CH₄ was in this group of patients. These results indicate the inhibition of the immune response in this category of patients. The correction of dysbiotic disorders is needed before pregnancy.

Keywords: vaginal microbiome, gas signaling molecules, lactobacilli.

Введение. 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 [1,3,4]. Это одна из причин доминирующего положения в составе вагинального микробиома здоровой женщины репродуктивного возраста штаммов лактобацилл, для которых гликоген является оптимальным субстратом для обеспечения жизнедеятельности.

Дополнительными факторами селективных преимуществ вагинальных лактобацилл по сравнению с другими микроорганизмами является высокая скорость размножения во влагалищной слизи, адгезия к поверхности эпителиоцитов с формированием биопленки, синтез перекиси водорода, лизоцима, бактериоцинов, стимуляция местного иммунитета [6]. Благодаря этим свойствам лактобациллы в процессе эволюции оказались наиболее приспособлены к колонизации влагалища и конкурентному вытеснению из него других микроорганизмов. Об этом свидетельствует высокая концентрация лактобацилл в вагинальном секрете (до 10^9 КОЕ/см³).

Помимо лактобацилл, в составе вагинального микробиома всегда присутствуют факультативные микроорганизмы. Их популяционный уровень в норме не превышает 3–4%, однако видовой состав достаточно разнообразен [1,2]. Все эти микроорганизмы являются условно-патогенными, и при снижении активности и популяционного уровня нормальной микробиоты могут вызывать различные заболевания.

При нормальном состоянии микробиома они непродолжительно персистируют в вагинальном биотопе, не увеличивая уровень своих популяций выше 10^4 КОЕ/см³ и не вызывая патологических изменений.

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]. Микроорганизмы в биопленке непрерывно обмениваются между собой сигнальными молекулами, активирующими или приостанавливающими развитие сообщества.

Целью данной работы являлся анализ состава и функциональной активности микробиома влагалища здоровых женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности, а также выявление продукции простых сигнальных молекул у лактобацилл.

Материалы и методы:

Обследуемые пациентки были разделены на 2 группы:

1. Основная группа – небеременные женщины, страдающие привычным невынашиванием (ПНБ) в анамнезе на этапе прегравидарной подготовки – 30 человек
2. Группа контроля – здоровые небеременные женщины в возрасте 19-23 лет - 30 человек.

Забор материала из влагалища производили в первую фазу менструального цикла 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 следующие среды – Эндо агар для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, микрококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера, M 304 - стрептококковый агар, МРС - лактоагар, Сабуро декстроза агар – для дрожжевых грибов, Колумбия кровяной агар – для энтерококков, бацилл, а также хромогенные среды фирмы «HiMedia». Для культивирования анаэробов использовали среды бифидоагар и кровяной Шедлер агар. Анаэробные условия создавались в анаэроштатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Количество колоний выражали в lg КОЕ/мл. Идентификация осуществлялась по биохимической активности с применением API систем (bioMérieux). В работе был использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито (Диаморф, Россия).

Производство газовых сигнальных молекул (H₂, O₂, N₂, CO, CH₄, CO₂, NO, H₂S) определяли с помощью метода газовой хроматографии на приборе Хроматэк-кристалл 5000.2, оснащенного детектором по теплопроводности (ДТП), пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и электрозахватным детектором (ЭЗД), подключенными последовательно, что обеспечивает одновременный анализ горючих и негорючих компонентов. Количество выделенных газов измеряли в ppm (от англ. *parts per million*, — «частей на миллион»), млн⁻¹ или мд. $1 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ ppm}$, $1 \text{ ppm} = 0.001 \text{ mg/mL}$.

Статистическая обработка данных и все расчеты производились с использованием пакетов программы IBM SPSS Statistics version 22 (Официальная лицензия от 21.02.2018 г.) и WINPEPI version 11.65 (J.H. Abramson, 2016).

Результаты исследований. В материале из влагалища 33 здоровых женщин (рис. 1) чаще выделялись лактобациллы (63,6% выявлений), энтерококки (57,6%), бифидобактерии (48,5%). Реже выделялись эпидермальные стафилококки, пептококки (36,4%), пептострептококки (33,3%), бациллы (27,3%), грибы рода *Candida* (21,2%), бактероиды (18,2%) и менее 10% проходило на золотистый стафилококк, стрептококки, микрококки, вейлонеллы, гарднереллы, актиномицеты.

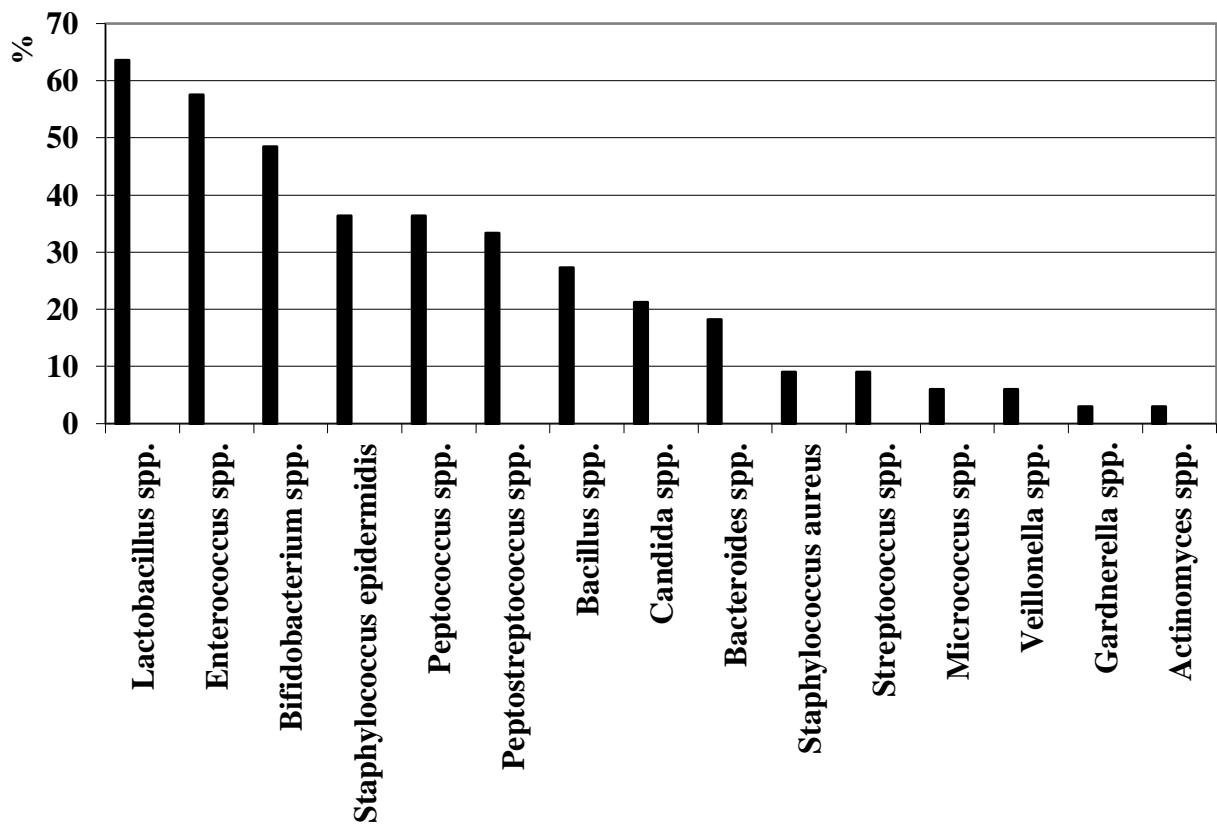
Количество микроорганизмов варьировало (рис. 2) от 2,2 lg КОЕ/см² у золотистого стафилококка до 6,77 lg КОЕ/см² у гарднерелл. Количество лактобацилл в среднем составляло 3,8 lg КОЕ/см², количество энтерококков,

бифидобактерий, пептококков, пептострептококков, бактероидов, микрококков, вейлонелл - более 4 lg КОЕ/см².

Микроорганизмы выделялись в ассоциации от 2-х до 6-ти, чаще лактобациллы, энтерококки, пептококки, пептострептококки, бифидобактерии, бактероиды.

Из исследуемого материала выделено 30 штаммов лактобацилл. С помощью API систем идентифицированы различные их виды: *L.rhamnosus*, *L.salivarius*, *L.acidophilus*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.buchneri*, *L.paracasei* spp.*paracasei*.

Рис. 1 Спектр и частота встречаемости микроорганизмов влагалища у здоровых девушек



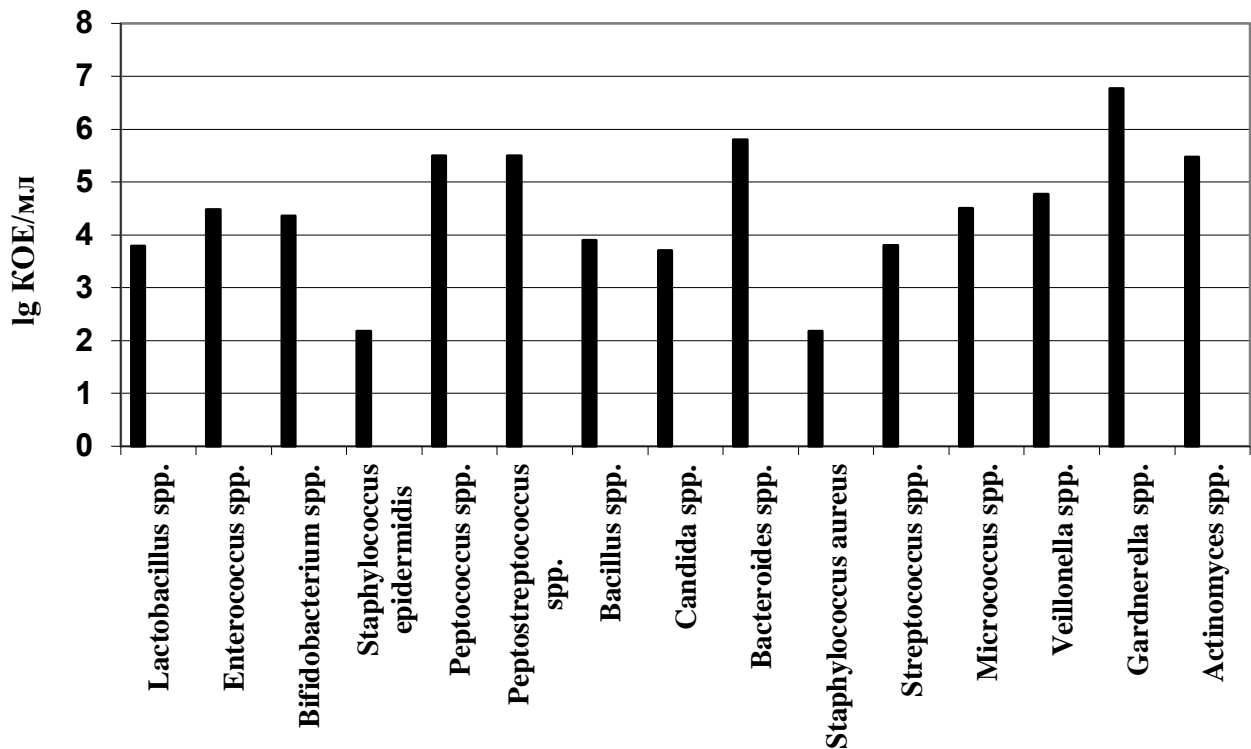


Рис. 2. Количество микроорганизмов влагалища у здоровых девушек

В 1-й группе небеременных с ПНБ (рис. 3) 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 КОЕ/см² (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 КОЕ/см² (от 2,63 до 3,83) высевались эпидермальный стафилококк, микрококки, энтерококки, стоматококки, бактероиды, кандиды, бациллы и лактобациллы.

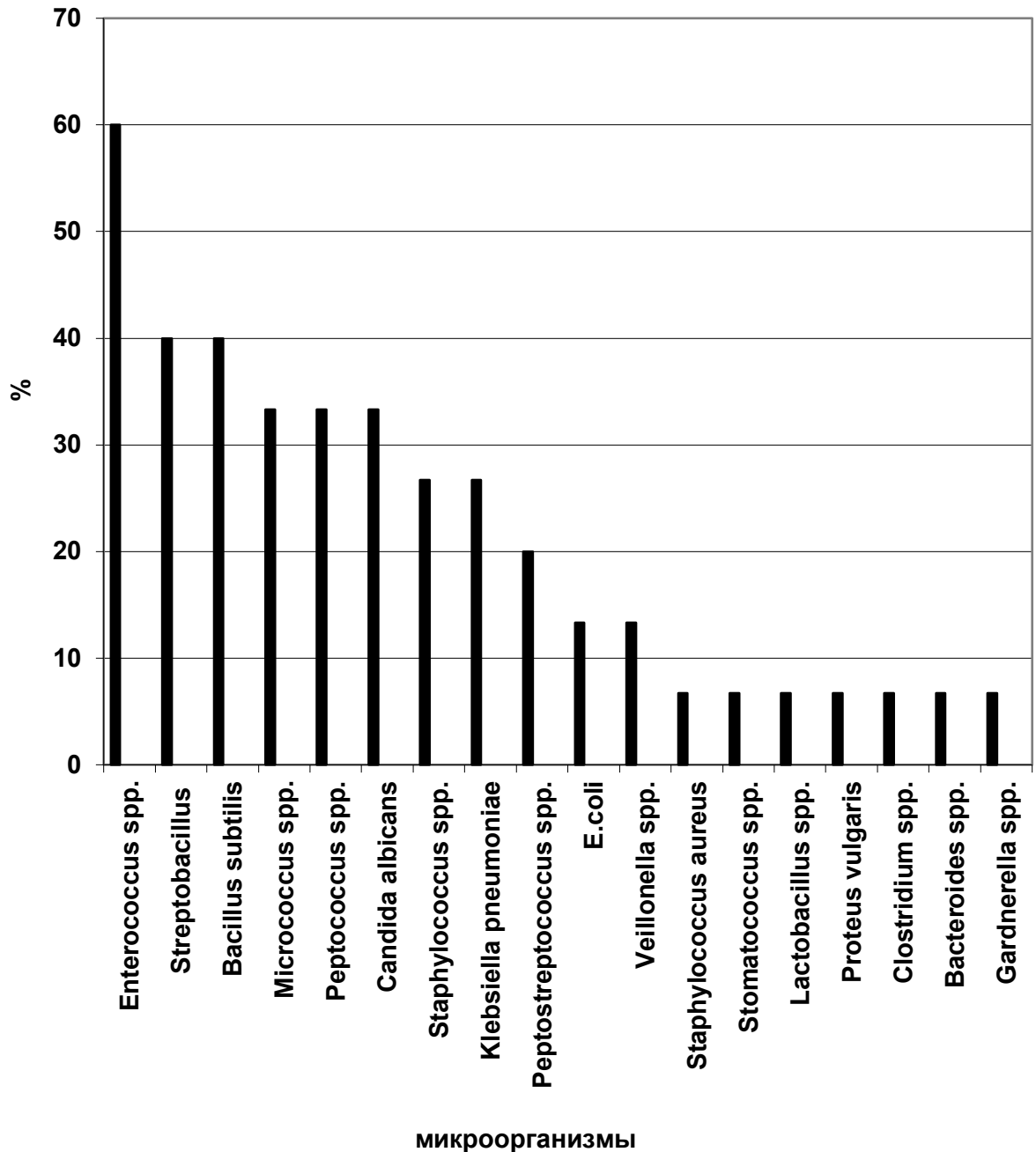


Рис. 3. Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у небеременных женщин с ПНБ.

В процессе своей жизнедеятельности лактобациллы вырабатывают разнообразные газовые сигнальные молекулы, но наиболее значимыми в группе здоровых женщин были результаты по трем газам: CO₂, CO и NO. Все выделенные штаммы лактобациллы выделяют большую концентрацию CO₂ (Me -35543 ppm), и активно потребляют O₂ (-7 ppm) и N₂ (-18 ppm).

Продукция CO была зарегистрирована у 23 штаммов лактобацилл (76,7%), Me – 218,5 ppm. У 7 штаммов (23,3%) обнаружены отрицательные результаты, т.е. они потребляют этот газ. Окись азота вырабатывают 27 штаммов лактобацилл в разных концентрациях, в основном относящимся к видам *Lactobacillus fermentum* и *L.plantarum*. У 9 штаммов (30%) концентрация NO

колебалась от 100 до 23752 ppm, Me составила 3568 ppm. У 18 штаммов бактерий (60%) концентрация окиси азота варьировала от 10 до 100 ppm (в среднем 45,3 ppm), и 3 штамма этот газ не выделяли.

Продукция других газов (H₂, CH₄, H₂S) была очень низкой, составляя не более 3 ppm.

Что касается пациенток с привычным невынашиванием беременности, то наиболее значимые результаты были получены также по трем газовым сигнальным молекулам – CO, NO и CO₂. Однако данные цифры оказались значительно ниже, чем в группе контроля: продукция NO составила в Me - 322 ppm, в то время как у здоровых женщин – Me 3568 ppm. Данные различия являются статистически достоверными (p=0,0054 Критерий Манна-Уитни 262). Также гораздо ниже оказалась продукция CO: Me – 51,3 ppm, что является статистически достоверным (p=0,0258, критерий Манна-Уитни - 289). Продукция же двух других газов H₂S и CH₄ в основной группе была выше, что также является достоверным (для H₂S Me = 7,4, критерий Манна-Уитни 13,5, p=0,01, для CH₄ Me = 2,81, p<0,0001, критерий Манна-Уитни – 100)



Рис.4

Продукция газовых сигнальных молекул лактобациллами в основной и контрольной группах.

За последние годы проведены многочисленные исследования, показывающие чрезвычайно важную роль данных газообразных веществ в организме человека. Так, окись азота способствует поддержанию гомеостаза сосудов, вызывая расслабление гладких мышц стенок сосудов и угнетая их рост

и утолщение интимы сосудов (гипертензивное ремоделирование сосудов), а также угнетая адгезию и агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов. Кроме того, данный газ секретируется фагоцитами в процессе иммунного ответа в качестве одного из свободных радикалов и является высокотоксичным для бактерий и внутриклеточных паразитов. Эндогенный угарный газ (СО) – также одна из важных эндогенных сигнальных молекул, модулирует функции ЦНС и сердечно-сосудистой системы, ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию к стенкам сосудов. Углекислый газ является одним из важнейших медиаторов ауторегуляции кровотока. Он является мощным вазодилататором, оказывает положительное хронотропное и инотропное действие на миокард, а также влияет на деятельность иммунной системы, повышает сопротивляемость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, участвует в обмене биологически активных веществ, влияет на проницаемость клеточных мембран и активность ферментов. СО₂ регулирует возбудимость нервных клеток, стабилизирует интенсивность продукции гормонов и степень их эффективности, участвует в процессе связывания белками ионов кальция и железа [5,6,7,8,9].

Выводы. Таким образом, установлено, что спектр основного микробиома влагалища здоровых женщин в возрасте 19-23 лет представлен бактериями нормальной микробиоты родов *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* (эпидермальные штаммы). Условно-патогенные грибы рода *Candida*, бактероиды, золотистый стафилококк, стрептококки, микрококки, вейлонеллы, гарднереллы и актиномицеты выделялись в редких случаях. Различные штаммы лактобацилл выделялась у 91% здоровых женщин. Среди газовых молекул, продуцируемых лактобациллами, преобладают: СО₂, СО и NO.

Установлены дисбиотические нарушения микробиома влагалища у небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе. Также у данной группы пациенток отмечено снижение продукции газовых сигнальных молекул: СО и NO, и повышение продукции Н₂S и СН₄. 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. Полученные результаты свидетельствуют о угнетении иммунного ответа у данной категории больных и необходимости коррекции дисбиотических нарушений еще на этапе прегравидарной подготовки.

Литература.

1. Анкирская А.С. Бактериальный вагиноз. Акушерство и гинекология. 2005;3:10–13
2. Гинцбург, А.Л. Ильина Т.С., Романова Ю.М. “Quorum sensing” или социальная жизнь бактерий .Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол. 2003;5: 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; XLVII(2): 8–11.
4. Плотко Е.Э., Донников А.Е., Ворошилина Е.С., Хаютин Л.В. Биocenоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? Акушерство и гинекология. 2011; 1: 66–70.
5. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Улучшение репродуктивного здоровья женщины путем оптимизации микроэкологии пищеварительного и урогенитального тракта. Репродукт. здоровье женщины. 2007; 3:148–154
6. Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Shenderov B.A. Vaginal microbiota in healthy women and patients with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis. Microbial Ecology in Health and Disease. 2006; 18: 71-74
7. L. Li, P.K. Moore. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. Biochemical Society Transactions. — Great Britain. 2007; 35 (5): 1138–1141.
8. Rui Wang. Gasotransmitters: growing pains and joys. Trends Biochemical Science. 2014. 39(5): 227–232.
9. 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. 2004: 2565–2573
10. 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.
11. Yulia Chervinets, Vyacheslav Chervinets, Boris Shenderov, Ekaterina Belyaeva, Andrey Troshin, Sergey Lebedev, Valery Danilenko. Adaptation and probiotic potential of lactobacilli, isolated from the oral cavity and intestines of healthy people (статья США). Probiotics and antimicrobial proteins. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.- Probiotics and antimicrobial proteins. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.- <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9348-9>. 2017.
12. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Петрова О.А., Ганина Е.Б. Метаболическая активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл здорового человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018; 4:11-17.