

Соснова Е.А.², Гаспарян А.А.¹, Тумбинская Л.В.¹, Ворошилина Е.С.³

Влияние глюкокортикоидной терапии на биоценоз влагалища у пациенток в постменопаузе

1- ООО «КДЛ-ДОМОДЕДОВО-ТЕСТ», г.Москва; 2-кафедра акушерства и гинекологии №1 Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва; 3- кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития, Медицинский центр «Гармония», г.Екатеринбург

Sosnova E.A., Gasparjan A.A., Tumbinskaja L.V., Voroshilina E.S.

The glucocorticoid therapy effect on vaginal biocenosis from menopausal women

Резюме

Были исследованы образцы соскобов из урогенитального тракта, полученные от 14 женщин в менопаузе, с системными заболеваниями и болезнями почек, получающих терапию глюкокортикоидами. Исследование проводили методом количественной ПЦР (тест Фемофлор, производства НПО «ДНК-Технология», Москва). Качественный и количественный состав биоценоза влагалища у пациенток в менопаузе, получающих терапию глюкокортикоидами, имеет отличия от такового у женщин вне терапии. Биоценоз влагалища пациенток с терапией глюкокортикоидами характеризует высокая частота встречаемости условно-патогенных облигатно-анаэробных микроорганизмов, снижением общей бактериальной массы и количества лактобактерий в составе биоценоза. Терапия глюкокортикоидами должна рассматриваться клиницистами как изолированный фактор формирования бессимптомных дисбиотических состояний микробиоценоза.

Ключевые слова: микрофлора влагалища, постменопаузе, дисбиоз влагалища, collagenозы, глюкокортикоиды, ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени

Summary

Urogenital tract scrapings collected from 14 menopausal women with systemic and kidney diseases treated with glucocorticoids were examined. The research was conducted with the method of quantitative PCR (test-system Femoflor, DNA-Technology LLC, Moscow). Qualitative and quantitative composition of vaginal microbiocenosis of menopausal patients receiving glucocorticoids varies from one in menopausal women not receiving therapy. Vaginal microbiocenosis in patients receiving glucocorticoid treatment is characterized with rate of dysbiotic disorders: low level of bacteria and normal flora and high level of anaerobic microorganisms. Therefore, this kind of treatment should be seen by clinicians as an isolated factor of formation of asymptomatic dysbiotic conditions of vaginal microbiocenosis.

Key words: normal flora, vaginal dysbiosis, collagen diseases, glucocorticoids, RT-PCR

Введение

Постменопауза у женщин характеризуется резким снижением концентрации половых гормонов и, прежде всего, уровня эстрогенов. Возрастные изменения гормонального профиля (гипоэстрогенные состояния) обуславливают морфологическую перестройку многослойного плоского эпителия стенки влагалища и сопровождаются снижением кровообращения в данной зоне. Аналогичные изменения могут также наблюдаться в ситуациях, спровоцированных гипоэстрогенной любого генеза, в частности – медикаментозной терапией, например, приемом глюкокортикоидов. При этом известно, что синтез гликогена клетками эпителия влагалища находится под контролем эстрогенов.

На фоне сниженной продукции гликогена происходит кардинальное изменение среды обитания вагинальной микрофлоры. Наиболее чувствительны к этому изменению представители нормальной микрофлоры влагалища - лактобактерии. Отсутствие гликогена, являющегося основным субстратом для лактобактерий, приводит к резкому снижению количества нормофлоры. Также снижается и общая обсемененность влагалища. Распространено мнение о частой колонизации влагалища в этот период «фекальной» микрофлорой, что в свою очередь является фактором высокого риска возникновения воспалительных процессов генитального тракта и развития восходящей мочевой инфекции.

Пациентки, получающие терапию глюкокортикоидами, находятся в заведомо худшем положении, чем при физиологической постменопаузе. На состояние их микробных сообществ дополнительное воздействие оказывает терапия глюкокортикоидами. Именно прием препаратов глюкокортикоидного ряда усугубляет атрофию слизистой и приводит к бессимптомному течению дисбиотических нарушений и присутствию в микробных сообществах широкого спектра условно-патогенной облигатно-анаэробной флоры. Следует помнить, что одним из важнейших условий стойкой ремиссии основного заболевания (коллагенозов) является тщательная санация любых источников инфекции.

Целью данной работы является описание влагалишного биоценоза, полученное при помощи ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени у женщин в постменопаузе, получающих терапию глюкокортикоидами.

Материалы и методы

В обследование были включены 14 женщин в возрасте от 40 до 67 лет, с системными заболеваниями и болезнями почек, получающих терапию глюкокортикоидами, наблюдавшихся в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева и в клинике акушерства и гинекологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, в период с февраля по май 2013 года. В качестве группы сравнения были отобраны 14 женщин в постменопаузе по принципу случай-контроль, совпадающие с пациентками из основной группы по следующим параметрам: возраст, продолжительность менопаузы, акушерско-гинекологический анамнез, состояние урогенитального тракта по данным визуального обследования.

Критериями исключения для группы сравнения являлись: наличие облигатно патогенных возбудителей инфекций, передающихся половым путем (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium*), сифилиса, системная или местная antimикробная или antimикотическая терапия в течение 4 недель до обследования, терапия глюкокортикоидами в течение года до начала обследования.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл транспортной среды, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам. ДНК микроорганизмов урогенитального тракта выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Исследование биоценоза влагалища проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием реагентов Фемофлор (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Классификацию вариантов биоценоза осуществляли в соответствии с ранее предложенным алгоритмом (2). Статистический анализ полученных результатов проводился при помощи таблиц EXCEL и программного па-

кета Statistica версии 8.0. В качестве меры центральной тенденции количественных признаков была выбрана медиана, а в качестве интервальной оценки — верхний и нижний квартили, т.к. исследуемые выборки не подчиняются закону нормального распределения. Результаты представлены как медиана, 25-75-й и 5-95-й проценти. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$ или $p = 0,001$.

Результаты и обсуждение

На момент обследования пациентки из группы «патология» принимали терапию глюкокортикоидами в период от 1 года до 16 лет. Средний возраст в группе женщин, получавших терапию глюкокортикоидами составил 56,4±7,4 года.

Причинами назначения глюкокортикоидной терапии явились системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, системная склеродермия, геморрагический васкулит, эозинофильный гранулематоз, ревматоидный артрит, гломерулонефрит.

При тщательном сборе анамнеза ни одна из обследованных женщин не предъявляла жалоб со стороны органов репродуктивной системы. Тем не менее, прицельный опрос выявил слабо выраженную симптоматику у 10 (71,4%) женщин. Зуд и жжение в области наружных половых органов отметили 6 (42,8%) пациенток, диспареунию 6 (42,8%), выделения из половых путей — 4 (28,5%). Не предъявляли никаких жалоб 4 (28,5%) женщины. В группе сравнения жалоб на зуд, жжение и диспареунию не было ни у одной женщины, на выделение из половых путей жаловалась 1 пациентка.

При микроскопическом исследовании отделяемого влагалища, у 4 (28,5%) пациенток обнаружили кокковую флору, у 7 (50%) женщин — смешанную, у 3 (21,5%) пациенток — палочковую. У 10 (71,4%) пациенток количество лейкоцитов варьировало в пределах от 5 до 10 в поле зрения, у остальных 4 (28,6%) женщин количество лейкоцитов не превышало 5 в поле зрения.

В группе сравнения только у 2 пациенток выявляли смешанную флору по результатам микроскопического исследования отделяемого влагалища, у 5 женщин была обнаружена кокковая флора, а у 7 женщин палочковая (различия между группами составили $p = 0,0039$). В группе сравнения при оценке количества лейкоцитов у абсолютного большинства женщин (11 пациенток, 78,5%) определяли до 5 лейкоцитов в поле зрения, у 3 (21,5%) женщин количество лейкоцитов варьировало в пределах от 5 до 10 в поле зрения, и ни у одной количество лейкоцитов не превысило 10 в поле зрения (различия между группами составили $p = 0,0006$).

На рисунке 1 представлена структура биоценозов влагалища у пациенток, принимающих глюкокортикоиды, по данным ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

По данным теста Фемофлор только у 1 пациентки нормальная микрофлора влагалища осталась сохранной и составляла не менее 80% от общей бактериальной мас-

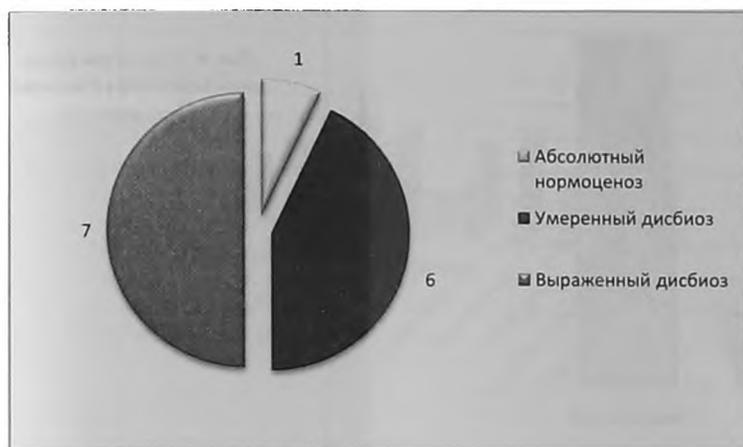


Рис. 1. Структура биоценозов влагалища пациенток, принимающих глюкокортикоиды (n=14).

Рис. 2. Структура биоценоза влагалища у женщин в постменопаузе в зависимости от приема глюкокортикоидных препаратов.



Рис. 3. Структура умеренного и выраженного дисбиоза у женщин в постменопаузе, получающих терапию глюкокортикоидами.

сы. У остальных женщин выявляли умеренные и выраженные дисбиотические нарушения. Выраженные дисбиотические нарушения обнаружили в половине всех случаев (у 7 пациенток), умеренные – в 6 (44,8 %).

Сравнили структуру биоценоза влагалища по результатам ПЦР-РВ у женщин с терапией глюкокортикоидами с контрольной группой – женщинами, подобранными по принципу случай-контроль (рис.2).

Структуры биоценозов в группах женщин были очень похожи. В обеих группах преобладали биоценозы

со сниженным количеством лактобактерий, абсолютные и условные нормоценозы практически не выявлялись. Это может быть связано с тем, что для женщин в постменопаузе в норме характерно снижение количества нормальной микрофлоры и увеличение в структуре биоценоза количества анаэробных микроорганизмов (1).

В формировании умеренных и выраженных дисбиотических нарушений (рис.3) у женщин с терапией глюкокортикоидами, в 10 случаев из 14 принимали участие облигатно-анаэробные микроорганизмы.

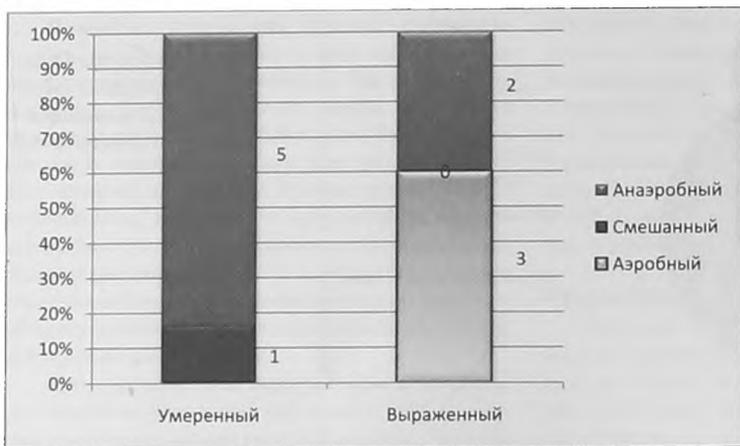


Рис. 4. Структура биоценоза влагалища у женщин в постменопаузе.

В 4 случаях выявляли смешанные дисбиотические нарушения, когда в составе биоценоза факультативно-анаэробные микроорганизмы присутствовали в количестве не менее 10% от всех выделенных микроорганизмов. В структуре выраженных дисбиозов соотношение между факультативно- и облигатно-анаэробными микроорганизмами продолжило сохраняться, по-прежнему лидирующую роль в формировании дисбиотических нарушений играли облигатные анаэробы (42,8% случаев – только облигатно-анаэробные микроорганизмы, 28,5% - в составе смешанных дисбиозов), и у 3 пациенток выявили уме-

ренные и выраженные дисбиотические нарушения, ассоциированные с аэробными микроорганизмами. Таким образом, ведущую роль в формировании как умеренных, так и выраженных дисбиотических нарушений играют облигатно-анаэробные микроорганизмы.

В группе сравнения (рис.4) в формировании умеренных дисбиотических нарушений в 6 случаях из 6 приняли участие облигатно-анаэробные микроорганизмы (у 5 женщин – изолированно, у 1 – в составе смешанного дисбиоза), что интересно, в структуре биоценозов, где лактофлора не сохранилась, преобладали факультативно-

Таблица 1. Количественный состав биоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста вне беременности в зависимости от терапии глюкокортикоидами (n=14)

Показатель	Группа женщин с терапией глюкокортикоидами (n=14)			Контрольная группа (n=27)		
	Медiana, Lg ГЭ	25 – 75 процентиль, Lg ГЭ	5 – 95 процентиль, Lg ГЭ	Медiana, Lg ГЭ	25 – 75 процентиль, Lg ГЭ	5 – 95 процентиль, Lg ГЭ
Общая бактериальная масса	6,1	5,3–6,8	4,5-7,4	6,8	6,4–7,2	5,2-8,0
<i>Lactobacillus</i> spp.	4,7	4,0–5,6	0,0-7,0	5,8	5,4–6,3	2,6-7,9
сем. Enterobacteriaceae	3,6	3,1 –4,3	0,0-5,4	3,2	2,5–3,3	2,0-6,7
<i>Streptococcus</i> spp.	4,0	0,0–4,9	0,0-5,4	3,3	1,3–4,0	0,0-4,7
<i>Staphylococcus</i> spp.	1,2*	1,0–1,7	0,7-3,5	2,9	2,1–3,0	1,5-4,3
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas</i> spp.	5,1	3,9–6,2	0,0-6,9	5,0	3,8–5,3	1,6-7,1
<i>Eubacterium</i> spp.	4,7	3,3–5,8	0,0-6,5	4,7	3,9–5,4	0,7-5,6
<i>Sneathia</i> spp.+ <i>Leptotrichia</i> spp.+ <i>Fusobacterium</i> spp.	1,3	0,2–3,3	0,0-5,8	2,5	1,3–3,4	0,0-5,8
<i>Megasphaera</i> spp.+ <i>Veillonella</i> spp.+ <i>Dialister</i> spp.	4,2	1,0–5,1	0,0-6,2	3,2	2,0-5,5	0,0-5,9
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	4,2	3,6–4,6	0,0-5,2	3,1	2,1–4,2	1,6-4,5
<i>Mobiluncus</i> spp.+ <i>Corynebacterium</i> spp.	3,9	0,8–4,3	0,0-4,8	3,9	2,6–4,3	0,0-4,5
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	3,5	0,0–4,6	0,0-5,4	4,1	2,3–4,5	0,0-5,7
<i>Atopobium vaginalae</i>	2,1	1,2–6,1	0,1-6,8	1,8	0,0–4,4	0,0-5,9
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,0	0,0–0,0	0,0-1,9	0,0	0,0–0,0	0,0-0,0
<i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	0,0	0,0–0,0	0,0-4,4	0,0	0,0–2,0	0,0-3,4
<i>Candida</i> spp.	1,6**	1,1–2,1	0,7-2,9	2,7	2,4–2,8	1,9-3,8

* p=0,0024

** p=0,0016

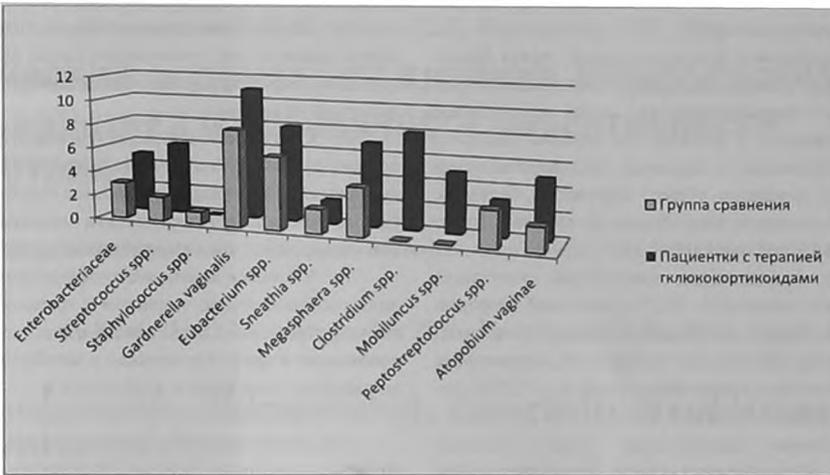


Рис.5. Частота выявления условно-патогенных микроорганизмов в диагностически значимых количествах (более 1% от всех микроорганизмов) у пациенток с терапией глюкокортикоидами и в группе сравнения.

анаэробные микроорганизмы (в 3 случаях из 5), в 2 случаях наблюдали доминирование облигатных анаэробов, а смешанные варианты вообще не встречались. Статистически значимых различий между группами по этому параметру нами обнаружено не было.

Анализ количественного состава биоценозов у женщин, получавших терапию глюкокортикоидами показал снижение количества бактерий в биоценозе (примерно в 4 раза относительно контрольной группы) (табл.1). На фоне снижения бактериальной массы в группе женщин в постменопаузе, принимавших терапию глюкокортикоидами, выявляли снижение количества лактобактерий по сравнению с контрольной группой более чем в 10 раз.

У пациенток с терапией глюкокортикоидами выявляли микроорганизмы рода *Staphylococcus* в статистически значимо меньших количествах, чем в контрольной группе. Также у этих женщин были обнаружены повышенные количества облигатно-анаэробных микроорганизмов из групп *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* и *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.*

По остальным исследованным микроорганизмам в биоценозах нами статистически значимых различий между группами обнаружено не было.

Для определения роли отдельных представителей условно-патогенной микрофлоры в формировании различных вариантов биоценоза влагалища оценили частоту их выявления в диагностически значимых количествах - в биоценозе доля микроорганизма составляла более 1% от суммы всех выделенных микроорганизмов (рис.5). Различия между группами по количеству участников биоценоза были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание тот факт, что в структуре микробного сообщества женщин в постменопаузе облигатно-анаэробные микроорганизмы играют значительную роль. Основными микроорганизмами, как по частоте встречаемости, так и по доле в биоценозе и в группе сравнения и в исследованной группе были *Gardnerella vaginalis* и *Eubacterium spp.* У здоровых женщин в пост-

менопаузе представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Sneathia spp.*, *Megasphaera spp.*, *Peptostreptococcus spp.* и *Atopobium vaginae* отмечали реже, чем в группе женщин, получавших терапию глюкокортикоидами, а *Lachnobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Corynebacterium spp.* у женщин, не получавших терапию глюкокортикоидами, не отмечали вообще. В группе сравнения у 1 пациентки были обнаружены микроорганизмы группы *Staphylococcus spp.*, в то время, как в исследованной группе ни у одной из женщин эти микроорганизмы диагностированы не были.

Таким образом, сообщества микроорганизмов влагалища пациенток, получающих терапию глюкокортикоидами представлены большим числом групп облигатно-анаэробных микроорганизмов, в количествах, превышающих 1% от общей бактериальной массы.

Молликуты и дрожжеподобные грибы в клинически значимых количествах были обнаружены у 3 пациенток, получающих терапию глюкокортикоидами и у 2 женщин из группы сравнения, при этом в группе сравнения у пациенток обнаруживали либо дрожжеподобные грибы (на фоне сохранной лактофлоры), либо микроорганизмы рода *Ureaplasma* (в случае умеренного дисбиотического расстройства), в исследованной группе дрожжеподобные грибы не встречались, в 2 случаях выявляли *Ureaplasma spp.*, а в одном – *Mycoplasma spp.*, все молликуты были представлены в сообществах с практически отсутствующими лактобактериями.

При анализе частоты встречаемости генитальных микоплазм и дрожжеподобных грибов рода *Candida* обнаружено, что частота выявления этих микроорганизмов в количестве более 104 ГЭ не различалась между исследованными группами.

В единственном случае для двух групп пациенток наблюдали микст-инфицирование *Ureaplasma spp.*+ *Mycoplasma spp.* для пациентки из основной группы на фоне значительного преобладания облигатно-анаэробной флоры влагалища (выраженного анаэробного дисбиоза).

Выводы

1. Качественный и количественный состав биоценоза влагалища у пациенток в постменопаузе, получающих терапию глюкокортикоидами, имеет значительные отличия от такового у женщин, вне терапии. Биоценоз влагалища пациенток с терапией глюкокортикоидами характеризует снижение общего количества бактерий, значительное снижение нормофлоры (более чем в 10 раз относительно контрольной группы).

2. При исследовании микрофлоры влагалища высокоточными методами - ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени только у 1 пациентки диагностировали абсолютный нормоценоз, выраженные дисбиотические нарушения обнаруживали у 7 (50%) пациенток, умеренные – у 6 (44,8 %).

3. Отмечена значительная роль условно-патогенных облигатно-анаэробных микроорганизмов представителей групп *Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp., *Megasphaera* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp. и *Atopobium vaginae* в формировании дисбиотических нарушений различной степени тяжести у пациенток, получающих терапию глюкокортикоидами. Сообщества микроорганизмов влагалища пациенток, получающих терапию глюкокортикоидами, представлены одновременно большим числом групп облигатно-анаэробных микроорганизмов.

4. Частота встречаемости генитальных микоплазм и дрожжеподобных грибов рода *Candida* в количестве более 104 ГЭ в группе пациенток, получающих терапию глюкокортикоидами, была такой же, как и в группе сравнения и составила 14-21%.

5. Пациентки в постменопаузе, получающие терапию препаратами глюкокортикоидного ряда, являются группой высокого риска восходящей инфекции мочевыделительной системы.

6. С целью стабилизации течения основного заболевания данная группа больных нуждается в тщательном исследовании влагалищного биотопа современными методами лабораторной диагностики выявления условно-патогенных облигатно-анаэробных микроорганизмов.

7. Учитывая изменение трофики слизистой влагалища, обусловленную возрастом и приемом препаратов глюкокортикоидного ряда, пациенткам данной группы необходимо с профилактической и лечебной целью местно назначать эстрогены и пробиотики.■

Л.В. Тумбинская, к.б.н., руководитель направления по развитию маркетинга ООО «КДЛ-ДОМОДЕДОВО-ТЕСТ», г. Москва; Е.А. Соснова, д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии №1 Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва; Е.С. Ворошилина, д.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России, Медицинский центр «Гармония», г.Екатеринбург; А.А. Гаспарян, аспирант кафедры акушерства и гинекологии №1 Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва; Автор, ответственный за переписку - Соснова Елена Алексеевна, кафедра акушерства и гинекологии №1 Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, sosnova-elena@inbox.ru, моб.тел.: 8-903-281-17-79.

Литература:

1. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Хаяутин Л.В. Биоценоз влагалища с

точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? Акушерство и гинекология. 2011; 01: стр. 57-65.