

Е.Ф. КИРА, О.Л. МОЛЧАНОВ,
И.В. БЕРЛЕВ

Кафедра акушерства и гинекологии,
Кафедра биохимии
Военно-медицинской академии,
Санкт-Петербург

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВЛАГАЛИЩНОЙ ЖИДКОСТИ. НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

Целью исследования явилось исследование влагалищной жидкости в рамках концепции биологической жидкости в норме и при бактериальном вагинозе (БВ). На основании полученных результатов определены закономерности функционирования микроэкосистемы влагалища в норме и патобиохимические механизмы формирования БВ.

Проблема инфекционных заболеваний женских половых органов продолжает оставаться чрезвычайно актуальной для акушерства и гинекологии. По данным ряда авторов около 70 % среди всех инфекционно-воспалительных заболеваний женской половой сферы приходится на болезни влагалища [6].

В последнее тридцатилетие на фоне повсеместного, часто нерационального, применения антибактериальных препаратов [3], увеличения частоты сексуально-трансмиссионных заболеваний, отмечается рост бактериального вагиноза (БВ) и неспецифических вагинитов, в этиологии которых большую роль принимают микроорганизмы из состава нормальной микрофлоры [8, 11].

Согласно современным статистическим данным в различных популяционных группах БВ встречается приблизительно от 20 до 65% [10, 12].

Бактериальный вагиноз с клинической точки зрения характеризуется появлением неприятно пахнущих выделений из влагалища при отсутствии в них патогенных возбудителей (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*) и признаков воспаления со стороны слизистой оболочки [1]. При этом диагностическим стандартом при установлении БВ являются клинико-лабораторные признаки, предложенные Amsel R. et al. в 1983 году [5]. К ним относятся:

- наличие гомогенных выделений, равномерно распределяющихся по стенкам влагалища;
- повышение уровня pH выше 4,5;
- положительный аминовый

тест (появление запаха «гнилой рыбы» при добавлении 10% гидроксида калия);

- обнаружение во влажных Грам-мазках «ключевых клеток».

В настоящее время отсутствует единое общепринятое мнение об этиологии БВ [11]. Большинство исследований направлено на изучение микробного фактора как основной причины БВ [9]. При этом часто определяется значимость тех или иных микроорганизмов в микробном спектре биоценоза влагалища [4], их чувствительность к антибактериальным препаратам [13].

Однако рассмотрение БВ только с микробиологических позиций не может объяснить закономерности механизмов развития данной патологии, определить причину формирования дисбиотического состояния влагалища и соответственно наметить основные патогенетические подходы в коррекции и лечении [7]. В доступной нам литературе систематизированные сведения о биохимическом составе влагалищной жидкости и изменениях в ее составе при БВ практически отсутствуют, а имеющиеся данные не несут системный характер и не могут объяснить биохимические патологические механизмы формирования БВ.

Целью настоящего исследования явилось изучение влагалищного содержимого с позиций концепции о биологической жидкости, а также определение закономерностей функционирования микроэкоистемы влагалища в норме и возможных биохимических механизмов формирования БВ.

Микроорганизмы	БВ	Контроль
	КОЕ/ml	КОЕ/ml
<i>Lactobacilli</i>	10^4-10^5	10^6
<i>Staphylococci</i>	10^4-10^5	10^5
<i>Corynebacteria</i>	10^5-10^6	10^5
<i>Streptococci</i>	10^5-10^6	10^5
<i>Peptococci</i>	10^5	-
<i>Peptostreptococci</i>	10^7-10^8	10^5
<i>Bacteroides</i>	10^7-10^8	10^5
<i>Bifidobacteria</i>	10^6-10^7	10^6
<i>Propionibacteria</i>	10^5-10^6	10^5
<i>Enterobacteria</i>	10^4-10^5	10^4

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 1995 по 1997 гг. нами обследовано 306 небеременных женщин репродуктивного возраста. Из них 210 больных БВ (основная группа) и 95 здоровых (контрольная группа).

У всех больных проводилось бактериологическое обследование по ранее предложенному алгоритму изучения типа биоценоза влагалища, а также культуральные и качественные исследования с использованием строгой анаэробной техники. [1].

Для биохимического анализа влагалищное содержимое получали при помощи ватного тампона типа «Тампакс» с гигроскопичностью 2 мл, который помещали в области верхней трети влагалища на 8 часов. После этого тампон помещали в специальный стерильный пластиковый контейнер и доставляли в лабораторию для последующей обработки. Посредством центрифугирования производили разделение на собственно влагалищную жидкость (ВЖ) и клеточный осадок, которые в дальнейшем и исследовались.

Стандартными методами определяли содержание: мочевины, глюкозы, холестерина, молочной и пирувиноградной кислот; содержания

ионов железа, меди, натрия, калия, магния, кальция, неорганического фосфора, хлоридов. Также определялась активность ферментов АЛТ, АСТ, амилазы, ЛДГ, щелочной фосфатазы, креатинкиназы. Проводилась осмометрия ВЖ, аминокислотный тест, определение жизнеспособности клеток эпителия влагалища и содержания в них ТБК-активных продуктов, а также наличия в мазке «ключевых клеток».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенные бактериологические исследования свидетельствуют, что строгие анаэробные микроорганизмы являются наиболее частыми представителями нормального биоценоза влагалища. При БВ их количество значительно увеличивается (табл. 1).

В таблице 2 представлены данные об основных биохимических параметрах ВЖ в норме и при БВ. Эти данные были получены нами впервые.

Согласно представленным данным при БВ происходят глубокие изменения, затрагивающие все звенья микрорекосистемы влагалища. Микробиологический состав изменяется в сторону видового и количественного доминирования строгой анаэробной и угнетения ацидофильной микрофлоры.

В эпителии влагалища выражены процессы дезинтеграции клеточных слоев и цитолиза, а в биохимическом составе ВЖ происходят достоверные изменения практически среди всех ключевых показателей.

Результаты проведенных нами исследований позволяют утверждать, что ВЖ является самостоятельной биологической жидкостью. Это объясняется тем, что во влагалищном содержимом присутствуют метаболиты, характерные для основных видов обмена (белкового, углеводного, липидного, водно-электролитного и минерального).

Кроме того установлено, что ВЖ является средой для жизнедеятельности сообщества микроорганизмов с которым она находится в постоянном взаимодействии.

Известно, что мочеполовая система в процессе внутриутробного развития имеет один источник - первичную почку. Исходя из этого есть все основания предположить, что эпителий влагалища и почечный эпителий имеют много общего в плане метаболической и функциональной активности. Одной из этих функций является поддержание кислотности ВЖ, которая в норме находится на уровне 3,8 - 4,2. Можно предположить, что этот показа-

Показатель	Норма	Бактериальный вагиноз
pH (Ед)	3.97±0.05	5.33±0.10
Осмолярность (мосмоль/кг)	301.02±7.83	364.24±9.03*
Мочевина (ммоль/л)	22.47±1.82	15.17±1.03
Общ. белок (г/л)	1.88±0.06	2.88±0.09
Глюкоза (ммоль/л)	4.34±0.56	1.67±0.52
Молочная кислота (мкмоль/л)	4.88±0.005	3.32±0.16*
Пировиноградная кислота (мкмоль/л)	0.17±0.005	0.13±0.004*
Холестерин (ммоль/л)	6.95±0.57	4.78±0.30*
АЛТ (Ед/л)	4.90±0.99	28.52±2.57
АСТ (Ед/л)	67.34±13.57	290.41±106.76
Амилаза (Ед/л)	59.48±11.94	176.49±59.17
ЛДГ (Ед/л)	133.36±26.82	519.12±101.20
Щелочная фосфатаза (Ед/л)	89.87±31.59	242.30±68.48*
Креатинкиназа (Ед/л)	27.66±9.27	54.97±11.07*
Железо (мкмоль/л)	388.59±32.58	217.81±15.96
Медь (мкмоль/л)	26.64±5.03	3.56±0.67
Магний (ммоль/л)	0.34±0.02	0.29±0.01
Кальций (ммоль/л)	9.35±0.53	6.96±0.40
Натрий (ммоль/л)	93.36±3.71	179.81±3.92
Калий (ммоль/л)	31.26±2.32	35.27±3.93
Хлориды (ммоль/л)	92.38±3.38	178.56±4.23
Фосфаты (ммоль/л)	6.22±0.69	5.73±0.33
Аминовый тест	отрицательный	положительный
Ключевые клетки	нет	есть
Жизнеспособность клеток эпителия	11.15±1.15	32.50±1.43*

* - отличия достоверны (p<0.05)

тель регулируется процессами ацидо- и аммионогенеза в эпителии влагалища.

Анализируя полученные биохимические результаты можно сказать следующее. Очевидно, что образующаяся в результате гомоферментного брожения глюкозы молочная кислота количественно не может поддерживать pH влагалищной жидкости в константных пределах.

Содержание белка во влагалищной жидкости незначительное, поэтому онкотическое давление не актуально в поддержании общего осмотического давления.

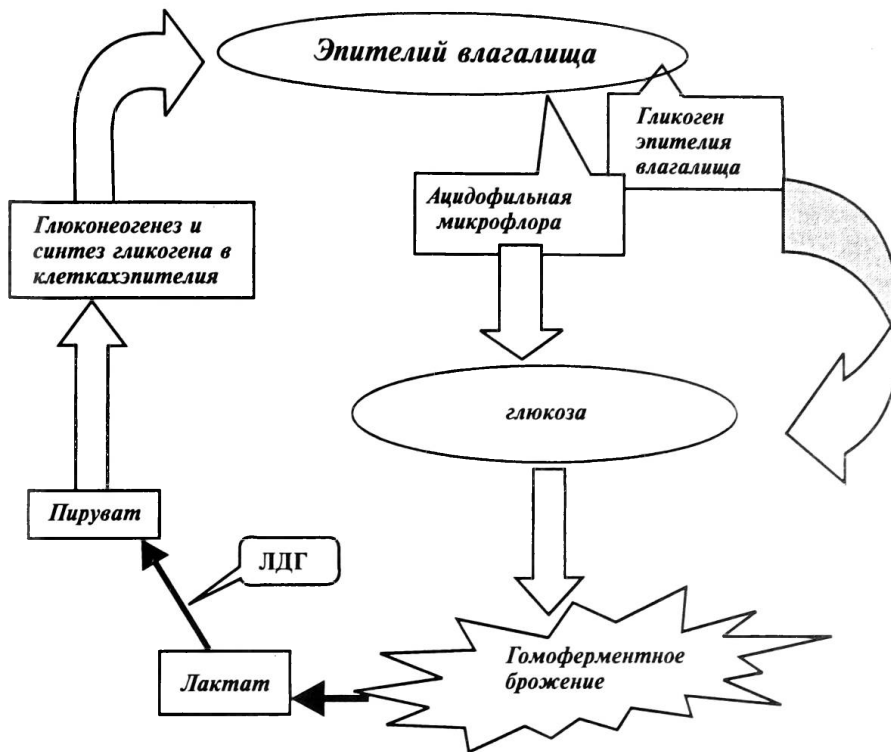
Мочевина и глюкоза во ВЖ являются с одной стороны субстратами для жизнедеятельности микроорганизмов, а с другой - выступая совместно с ионами натрия как осмотически активные вещества, определяют водно-электролитный баланс ВЖ.

Из микроэлементов во влагалищной жидкости определены ионы железа, меди, магния, кальция, калия, хлориды, фосфаты. Они выполняют функции коферментов, входят в состав активных центров ряда белков, ответственных за местный им-

мунитет, определяя их структуру, а также необходимы для нормального функционирования микроорганизмов и регулируют red-ox - потенциал клеток эпителия.

Как уже отмечено выше, в норме микробиологическое сообщество в основном представлено кислотофильными микроорганизмами в титре $10^6 - 10^8$ КОЕ/мл. Жизнедеятельность нормальной микрофлоры связана с процессами гомоферментного и бифидоброжения глюкозы в результате которых образуются молочная и уксусная кислоты.

Схема 1. Функционирование микроэкосистемы влагалища в условиях нормоценоза



Гомоферментное брожение

Глюкоза — — —> 2 лактат

Бифидоброжение

Глюкоза — — —> 3 ацетат + 2 лактат

Глюкоза образуется в результате гидролитического расщепления гликогена, который поступает из богатых этим субстратом клеток поверхностного слоя эпителия влагалища. Эта реакция протекает под действием фермента амилазы, активность которой также определена во ВЖ.

Образовавшаяся молочная кислота в обратной лактатдегидрогеназной реакции превращается в пировиноградную кислоту. Последняя используется эпителием в процессах глюконеогенеза и в дальнейшем - для ресинтеза гликогена.

Таким образом, можно предположить, что в норме поддержание постоянства внутренней среды влагалища происходит по механизму, представленному в схеме 1.

При БВ все происходит иначе (схема 2). По нашему мнению ключевым пусковым фактором

для развития БВ является изменение рН ВЖ, а именно, смещение ее в щелочную лочную сторону (>4,5). В свою очередь изменение кислотности приводит к созданию неблагоприятных условий для жизнедеятельности нормальной микрофлоры влагалища, главным образом - лактобактерий и, напротив, благоприятствует размножению полиморфного микробного сообщества (мобилиункус, бактероиды, пептококки, пептострептококки, вейллонеллы и др.). То есть, изменение рН является не следствием БВ, а его причиной. Во многом это связано с нарушениями регуляторной функции эпителия влагалища, обусловленной процессами цитолиза и дезинтеграции клеток, что может объясняться разными причинами: «скрытой» и/или хронической урогенитальной инфекцией, изменениями гормонального статуса, кислотно-основного состояния, соматическими заболеваниями, нерациональной антибиотикотерапией, неблагоприятными факторами внешней среды и др.

Повышение концентрации

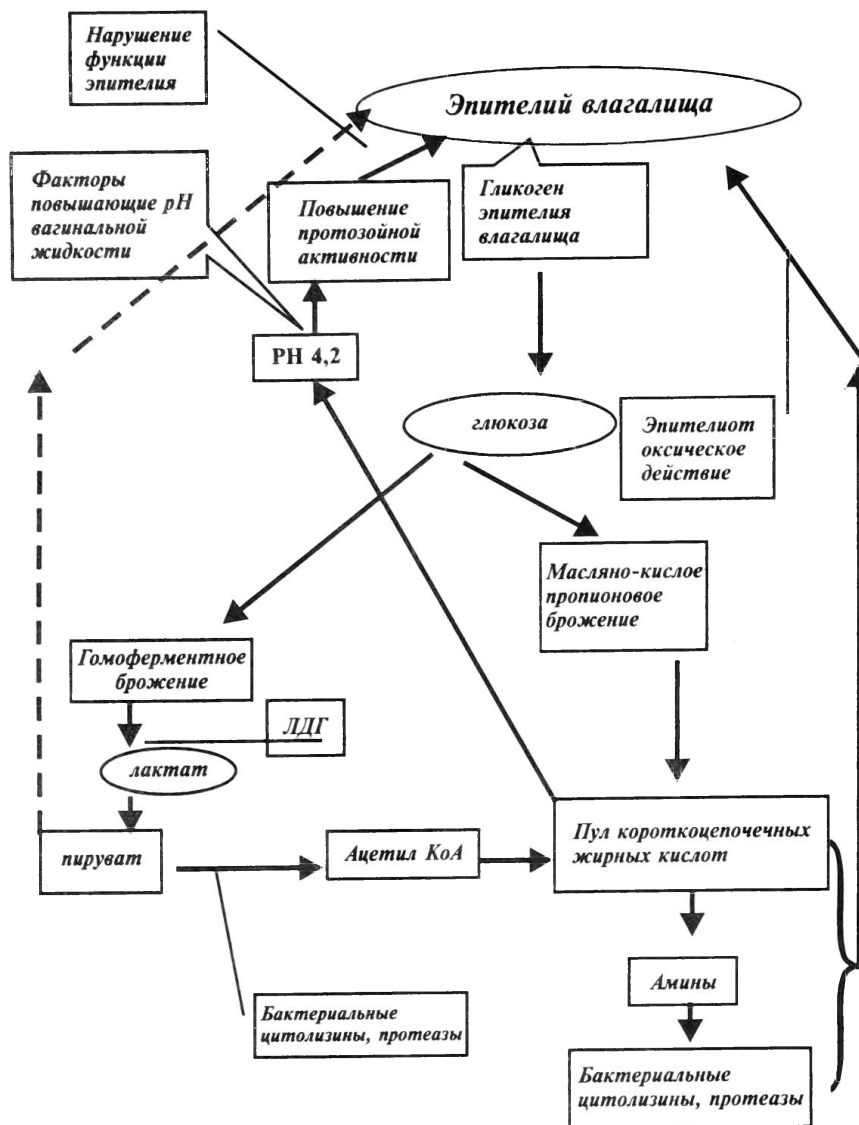
ионов Na^+ и Cl^- также свидетельствует о нарушении функции эпителия в отношении реабсорбции. Следует отметить, что указанное повышение концентрации ионов Na^+ может быть одновременно и компенсаторным механизмом, поскольку при БВ наблюдается снижение концентрации осмотически активных веществ (глюкоза и мочевины). Компенсаторное повышение концентрации ионов Na^+ приводит к повышению гидратации, проявлением чего и является наличие обильных жидких выделений - основного проявления БВ.

Другим, не менее важным фактом, обусловленным увеличением рН ВЖ, является повышение при БВ активности протеолитических ферментов, таких как: пролинаминопептидаза, сиалаза, муциназа. Вследствие этого происходит гидролитическое расщепление белковых макромолекул, в том числе и коллагена, что приводит к дезинтеграции клеток эпителия, нарушению их функции и повышению концентрации свободных жизнеспособных клеток во ВЖ. Эти клетки становятся субстратом для обеспечения жизнедеятельности анаэробных, ассоциированных с БВ, микроорганизмов. Активация ферментов сиалазы и муциназы приводит к нарушению слизиобразования, что облегчает доступность для микроорганизмов клеток эпителия. Повышение адгезивной способности этих микроорганизмов происходит за счет модификации клеточных рецепторов микробными протеазами, повышения рН ВЖ, снижения red-ox-потенциала эпителия влагалища.

В норме во ВЖ обнаружена активность внутриклеточных ферментов АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы.

При БВ активность этих ферментов достоверно повышена. Это свидетельствует об активации цитолитических процессов. В пользу этого можно отнести и статистически значимое увеличение уровня ТБК-активных про-

Схема 2. Функционирование микроэкосистемы влагалища в условиях формирования бактериального вагиноза



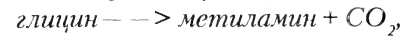
дуктов в эпителии влагалища. Однако, поскольку при БВ отсутствуют признаки воспаления, повышение уровня показателей перекисного окисления липидов можно отнести не как следствие воспалительной реакции, а скорее как проявление ускоренных процессов пролиферации клеток эпителия влагалища, при этом цитолитические процессы скорее связаны с воздействием на клетки микробных цитолизин.

В обеспечении метаболизма анаэробов, ассоциированных с БВ большое значение имеют ферменты – декарбоксилазы, действие которых направлено на декарбоксилирование аминокислот. В ре-

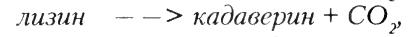
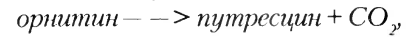
зультате этого образуются биогенные амины и углекислый газ. Последний важен с точки зрения создания бескислородных условий среды, при котором происходит соответствующее снижение парциального давления кислорода. Этим обусловлены условия, необходимые для размножения и жизнедеятельности анаэробной микрофлоры.

В диагностическом плане при БВ важным является аминовый тест, заключающийся в том, что после добавления к влагалищной жидкости 10% раствора КОН определяется неприятный гнилостный рыбный запах. При выраженных проявлениях бактери-

ального вагиноза этот запах определяется органолептически и зависит от присутствия летучих аминов, таких как: метиламин, диметиламин, триметиламин, кадаверин, путресцин. Эти метаболиты образуются в основном в следующих реакциях:



в последующем из метиламина под действием ферментов - метилаз анаэробов образуются диметил- и триметиламин.



Кроме этого, под действием анаэробной микрофлоры могут образовываться такие соединения, как сероводород; метилмеркаптан (при распаде серосодержащих аминокислот - цистеина, цистина, метионина). В результате распада ароматических аминокислот образуются такие соединения, как фенилэтиламин, тирамин, триптамин, крезол, фенол, скатол, индол. Эти метаболиты не только обладают характерным неприятным запахом «гнилой рыбы», но и могут оказывать цитотоксическое действие на эпителиальные клетки.

В результате наших исследований по определению жизнеспособности эпителиальных клеток во влагалищной жидкости было установлено, что в группе женщин не предъявляющих жалоб и имеющих высокий уровень кислотности влагалищной жидкости количество жизнеспособных клеток не превышало 12%. При БВ этот показатель был значительно выше (18 - 60%). Наличие этого факта позволяет определить еще одно звено в развитии бактериального вагиноза.

Дефект соединительнотканной основы приводит к нарушению сцепления клеток эпителия и повышению их содержания во влагалищной жидкости. Поскольку в норме поверхностный слой богатых гликогеном клеток представлен в основном нежизнеспособными клетками эпителия, в которых процессы синтеза макроэргов практически отсутствуют,

появление жизнеспособных создаст анаэробам условия для обеспечения их метаболизма.

В свою очередь в этих клетках не накапливается гликоген - основной субстрат метаболической активности лактобактерий, что приводит к уменьшению их титра в содержимом влагалища. Кроме того, повышение рН неблагоприятно сказывается на росте кислотофильной микрофлоры, которая в процессе жизнедеятельности способствует оптимизации среды, повышая кислотность влагалищной жидкости за счет образования молочной и уксусной кислот. Как следствие снижения титра лактофлоры происходит нарушение процессов образования перекиси водорода, обеспечивающей бактерицидность и вируцидность ВЖ.

Глюкоза во ВЖ под влиянием ферментов бактерий превращается в лактат, который под влиянием фермента лактатдегидрогеназы переводится в пировиноградную кислоту; последняя в норме используется эпителием влагалища в реакциях глюконеогенеза и, ресинтезируемая в результате этого глюкоза, снова депонируется в клетках эпителия в виде гликогена.

При БВ гипертрофированная анаэробная флора утилизирует пировиноградную кислоту в пироватдегидрогеназной реакции или непосредственно глюкозу в пироватдегидрогеназной реакции с образованием ацетил-СоА, который используется в дальнейшем для синтеза жирных кислот с короткой углеродной цепью (С3 - С6) - газохроматографических маркерных метаболитов при БВ.

В результате этого истощается пул свободной глюкозы, запасы гликогена в эпителиальных клетках не восполняются в полной мере и, как итог этого, происходит нарушение метаболической базы для нормальной кислотофильной микрофлоры. Анаэробная, ассоциированная с БВ микрофлора, для метаболических

и энергетических целей может использовать помимо глюкозы и другие источники («ключевые клетки», альтернативные глюкозе субстраты, использовать электрохимический потенциал ионов Na^+ для синтеза АТФ).

Таким образом, в результате анализа патологических биохимических закономерностей формирования БВ установлены следующие ключевые звенья, указывающие на приоритетность метаболических нарушений:

- существенное повышение рН влагалищной жидкости;

- повышение активности протеолитических ферментов;

- дезинтеграция клеток влагалищного эпителия, нарушение функции последнего, образование «ключевых клеток»;

- использование пировиноградной кислоты анаэробами в пироватдегидрогеназной реакции и, как следствие этого, нарушение процессов глюконеогенеза клетками эпителия влагалища, снижение резервов гликогена и нарушение метаболической субстратной базы для кислотофильной микрофлоры влагалища;

- многократное повышение титра облигатных анаэробных и угнетение кислотофильных микроорганизмов при создании оптимальных для них условий в микроэкосистеме влагалища.

Таким образом, на основании полученных результатов о биохимическом составе ВЖ в норме и при БВ удалось установить новые, ранее не изученные аспекты поддержания постоянства внутренней среды влагалища, а также получить интересные данные о патогенезе БВ, что с новых позиций позволит в ближайшем будущем оптимизировать существующие методы коррекции биоценоза и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний влагалища.

Литература

1. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. Клиника, диагностика, лечение // Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - СПб, 1995. - 44 с.

2. Келети Т. Основы ферментативного катализа. - М.: Мир, 1990. - 348 с.

2. Тюрин М.В., Шендеров Б.А. Влияние химиопрепаратов на биологические свойства лактобацилл экспериментальных животных // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. - 1991. - №6. - С. 6 - 9.

3. Хотенашвили Л.Д. Роль *Gardnerella vaginalis* в воспалительной патологии урогенитального тракта женщины: (Клинико-лаб. и электронно-микроскоп. исслед.): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - 1988. - 11 с.

4. Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A. et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations // Amer. J. Med. - 1983. - Vol. 74, N1. - P. 14- 22.

5. Anderson J.R. Genital tract infection in women // Med. Clin. North Am. - 1995. - Vol. 79, N.6. - P. 1271.

6. Chaim A., Mazor M., Liberman J.R. The relationship between bacterial vaginosis and preterm birth. // Arch. Gynecol. Obstet. - 1997. - Vol. 259, N.2. - P. 51-58.

7. Dattani I.M., Gercen A., Evans B.A. Aethiology and menagement of non-specific vaginitis // Brit. J. Vener. Dis. - 1982. - Vol. 58, N 1. - P. 32 - 35.

8. Hammann R., Lang N., Werner H. Die Rolle von *Gardnerella vaginalis* und Anaerobiern Atiologie der unspezifischen Kolpitis // Fortschr. Med. - 1984. - Vol. 102, N. 10. - P. 255 - 258.

9. Mardh P.-A. Epidemiology of bacterial vaginosis // Amer. J. Obstet. Gynecol. - 1993. - Vol. 169, N.2, Suppl.7. - P. 446 - 450.

10. Mardh P.-A. Bacterial vaginosis or ...? Abstract book third international symposium on vaginitis/vaginosis. - Funchal, Portugal: S.n., 1994. - Abstr. 1.

11. Paavonen I., Kallings J., Norling B. et al. Therapy of bacterial vaginosis // Bacterial vaginosis / Ed. Per-Anderson Mardh and David Taylor-Robinson. - Stockholm: Almquist and Wiksell intern., 1984. - P. 265-266.

12. Schmitt C., Sobel J., Meriwether C. Bacterial vaginosis : treatment with clindamycin cream versus oral metronidazole // Obstet. Gynecol. - 1992. - Vol. 79, N6. - P. 1020-1023.