

На правах рукописи

Теровская Татьяна Юрьевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК
ВАГИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН
ПРИ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ ВЛАГАЛИЩА**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Красножёнов Евгений Павлович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Потапов Алексей Валерьевич
кандидат медицинских наук Бухарина Ирина Юрьевна

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кемеровская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Кемерово.

Защита состоится « » 2009 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава» (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава».

Автореферат разослан « » 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Герасимов А.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В дерматовенерологии и гинекологии урогенитальные инфекции приобрели статус актуальной научной и клинической проблемы, так как публикации последних лет свидетельствуют об устойчивой тенденции к росту числа больных с инфекциями влагалища [Байрамова Г.Р., 2001; Анкирская А.С., 2006; Кира Е.Ф., 2008]. Реальную значимость приобретает возрастающая роль возбудителей оппортунистических вагинальных инфекций – условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее распространенными оппортунистическими вагинальными инфекциями в настоящее время остаются вагинальный кандидоз, неспецифический вагинит и бактериальный вагиноз [Анкирская А.С., 2000; Сергеев А.Ю., 2000; Дмитриев Г.А., 2008].

Исследователи отмечают, что к 25 годам примерно половина всех женщин имеет хотя бы один эпизод кандидозного вульвовагинита, установленный врачом [Sobel J.D., 1993; Карпунина Т.И., 2003; Коломойцева Т.Н., 2004]. Неспецифические вагиниты составляют, по мнению ряда авторов, до 40% случаев обращения к гинекологам [Кисина В.И., 2005; Кира Е.Ф., 2008]. Бактериальный вагиноз обнаруживается в 30-50% среди вульвовагинитов, являясь предметом пристального изучения клиницистов и микробиологов во многих странах мира [Акопян Т.Э., 1996; Анкирская А.С., 2003]. Нет единого мнения исследователей по поводу состояния иммунитета при оппортунистических вагинальных инфекциях: изменения его при этих заболеваниях могут носить как общий, так и местный характер [Сергеев А.Ю., 2000; Коломойцева Т.Н., 2003; Кира Е.Ф., 2008].

В последнее время огромная роль при оппортунистических вагинальных инфекциях отводится факторам воздействия на макроорганизм метаболитов, образуемых условно-патогенными микроорганизмами. Экзо- и эндоферменты грибов рода *Candida*, стрептолизины, стрептокиназы, гиалуронидазы, липопротеиназы кокко-бациллярной флоры приводят к деградации эпителиоцитов, гибели или дисфункции лейкоцитов [Сергеев А.Ю., 2000; Анкирская А.С., 2006]. Рядом исследователей отмечена связь бактериального вагиноза с неопластическими процессами шейки матки: нитрозамины (продукты метаболизма строгих анаэробов) являются коферментами канцерогенеза и могут быть причастны к развитию карциномы

[Анكيرская А.С., 2003; Дмитриев Г.А., 2008]. Метаболиты условно-патогенных микроорганизмов играют роль в развитии воспалительных заболеваний органов малого таза, способствуют преждевременным родам, либо инфицированию плода [Анكيرская А.С., 2006].

Основу местной противоинойфекционной защиты составляет колонизационная резистентность, подразумевающая совокупность механизмов, придающих индивидуальную стабильность нормальной микрофлоре и обеспечивающая предотвращение заселения организма хозяина патогенными или условно-патогенными микроорганизмами. Динамическое равновесие в системе «макроорганизм-микрофлора-окружающая среда» на слизистой оболочке влагалища поддерживается благодаря многочисленным функциям индигенной микрофлоры, состоянию вагинального эпителия и факторам местной иммунной защиты: нейтрофильным гранулоцитам, лимфоцитам, макрофагам, лизоциму, секреторным иммуноглобулинам и др. [Санин А.В., 1993; Зиновьев А.С., 1997; Афанасьев С.С., 2004].

В настоящее время активно изучаются факторы местной противоинойфекционной защиты слизистой оболочки влагалища при различных оппортунистических вагинальных инфекциях, однако характеризующие их показатели (лейкоцитарная реакция, уровень иммуноглобулинов, лизоцима и каталазы вагинальной жидкости), часто имеют противоречивый характер [Афанасьев С.С., 2000; Лебедева Т.Н., 2001; Рыбников Н.В., 2004]. В исследованиях сообщается о повреждающем действии метаболитов условно-патогенных микроорганизмов, но нет данных о степени повреждения эпителиоцитов и их количестве в вагинальной жидкости при различных оппортунистических инфекциях. Вопросы о воздействии условно-патогенных микроорганизмов на факторы, обуславливающие местную колонизационную резистентность, до сих пор остаются дискуссионными [Леденёва Л.И., 1996; Коршунов В.М., 1999; Никоненко А.Г., 2005].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о необходимости более полного изучения морфофункционального состояния слизистой оболочки влагалища при оппортунистических вагинальных инфекциях, чтобы объективно оценить риск их возможного влияния на развитие гинекологических осложнений. Немаловажной остается проблема определения наиболее

показательных методов дифференцирования неспецифического вагинита, вагинального кандидоза и бактериального вагиноза, имеющих сходные клинико-симптоматические признаки.

Все вышеуказанное определяет актуальность представленной темы в теоретическом и практическом аспектах.

Цель исследования: оценить роль изменений морфофункционального состояния эукариотических и прокариотических клеток вагинальной жидкости в поддержании колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе.

Задачи исследования:

1. Изучить морфофункциональное состояние эпителиальных клеток отделяемого слизистой оболочки влагалища у пациентов при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините, бактериальном вагинозе.

2. Изучить морфофункциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов и макрофагов в вагинальной жидкости у пациентов, страдающих вагинальным кандидозом, неспецифическим вагинитом, бактериальным вагинозом.

3. Определить количественное содержание эукариотических клеток микробного происхождения *Candida albicans* в вагинальной жидкости у больных вагинальным кандидозом, неспецифическим вагинитом, бактериальным вагинозом для выявления дисбаланса в микробиоценозе влагалища.

4. Исследовать количественные и качественные характеристики прокариотических клеток микробного происхождения (кокко-бациллярной флоры) в отделяемом слизистой оболочки влагалища у пациентов с вагинальным кандидозом, неспецифическим вагинитом, бактериальным вагинозом.

5. Определить индикаторные показатели оценки состояния колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе.

6. Определить роль особенности взаимодействия эукариотических и прокариотических клеток отделяемого влагалища в обеспечении противoinфекционной защиты при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе.

Научная новизна. Впервые дана сравнительная оценка морфофункционального состояния показателей эукариотических и прокариотических клеток отделяемого слизистой оболочки влагалища женщин, страдающих неспецифическим вагинитом, вагинальным кандидозом и бактериальным вагинозом. Показано, что у пациентов с неспецифическим вагинитом и вагинальным кандидозом отмечаются высокие показатели каталазы и секреторного иммуноглобулина А, количества лейкоцитов, степени жизнеспособности и кислородзависимого метаболизма нейтрофилов. У пациентов, страдающих бактериальным вагинозом, отмечен наиболее низкий уровень количества, жизнеспособности и кислородзависимого метаболизма лейкоцитов, а так же каталазы, секреторного иммуноглобулина А в вагинальной жидкости. У всех пациентов с оппортунистическими вагинальными инфекциями отмечены значительные количества эпителиоцитов высокой степени деструкции и низкие показатели лизоцима и миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов в отделяемом влагалища.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящая работа содержит теоретические данные, существенно расширяющие представления о природе и роли «местного иммунитета», а с ним и о физиологических аспектах морфофункционального состояния отделяемого слизистой оболочки влагалища.

Представленная работа вносит вклад в более полное и всестороннее изучение патологических процессов на слизистой оболочке влагалища при заболеваниях, вызванных условно-патогенными микроорганизмами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе изменения морфофункционального состояния клеток вагинальной жидкости носят разнонаправленный характер. При неспецифическом вагините и вагинальном кандидозе метаболиты условно-патогенных микроорганизмов стимулируют привлечение лейкоцитов из кровяного русла, подавляют функциональную активность нейтрофилов и макрофагов, не влияя на способность лимфоцитов к выработке иммуноглобулина А. При бактериальном вагинозе метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами, ингибируют привлечение лейкоцитов, подавляют функциональную активность нейтрофилов, макрофагов и

лимфоцитов, обладают наиболее выраженными цитотоксическими свойствами.

2. Индикаторами колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища являются: степень деструкции эпителиоцитов, количество лейкоцитов, микробный статус, активность каталазы, рН, концентрация секреторного иммуноглобулина А в вагинальной жидкости. Нарушения морфофункционального состояния клеток отделяемого слизистой оболочки влагалища при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе (высокая деструкция вагинального эпителия, снижение функциональной активности лейкоцитов, дисбаланс нормальной микрофлоры) указывают на подавление колонизационной резистентности репродуктивного тракта.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на VII международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2006); на VIII международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007); на Российской научно-практической конференции «Современные аспекты этиопатогенеза, диагностики и лечения рака эндометрия» (Томск, 2007); на научно-практической конференции «Актуальные вопросы лучевой, функциональной и лабораторной диагностики» (Северск, 2007); на IX международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2008); на ежегодной научной конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Томск, 2008); на заседании областного научно-практического общества бактериологов (Томск, 2009).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них – 4 в журналах, рекомендованных перечнем ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы, включающего 208 источников, из которых 139 отечественных и 69 иностранных. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 15 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе представлены результаты комплексного обследования 57 женщин в возрасте от 18 до 40 лет с оппортунистическими вагинальными инфекциями (ОВИ), которые, в зависимости от этиологического фактора, были разделены на три группы: 18 женщин с вагинальным кандидозом (ВК), 25 – с неспецифическим вагинитом (НВ), 14 – с бактериальным вагинозом (БВ). Верификация диагноза проводилась путем комплексного лабораторно-диагностического обследования пациентов, включающего бактериоскопические и культуральные исследования. Женщины с ОВИ предъявляли жалобы на патологические вагинальные выделения, зуд и дискомфорт в области половых органов.

В контрольную группу были включены 20 клинически здоровых женщин с аналогичными возрастными характеристиками, не предъявлявших на момент осмотра жалоб, в ходе обследования которых не были выявлены ОВИ.

Критерии исключения: инфекции, передающиеся половым путем, изменения характерные для наступления ранней менопаузы, тяжелые соматические патологии, гормональные нарушения, беременность.

Пациенты наблюдались на базе женской консультации Клинической больницы №81 ФМБА России (г.Северск). Исследования проводились на кафедре микробиологии и вирусологии СибГМУ, в лаборатории клинической микробиологии Клинической больницы №81(г.Северск), в лаборатории клеточных и молекулярно-биологических исследований НИИ ПЗ СО РАМН (г.Томск).

Материалом исследования служила вагинальная жидкость (ВЖ). Осмотр пациентов и забор материала осуществляла врач-гинеколог женской консультации. Исследование проводилось в соответствии с общепринятыми этическими требованиями.

Методы исследования:

1. Клинические методы: анализ анамнестических данных и гинекологический осмотр.

2. Цитологические методы:

а) Микроскопическое исследование ВЖ. Количественная и качественная оценка вагинальной микрофлоры оценивалась по

критерию R.P. Nugent в модификации Анкирской А.С. [Nugent R.P. et al., 1991, Анкирская А.С., 2006];

б) Оценка степени деструкции вагинальных эпителиоцитов [Матвеева Л.А., 1973];

в) Подсчет лейкоцитов и эпителиоцитов в ВЖ осуществляли стандартными гематологическими методами [Козловская Л.В., 1975].

3. Цитохимические методы:

а) Определение степени жизнеспособности лейкоцитов в отделяемом влагалища [Держинская И.И., 1988; Соколов Е.И., 1998];

б) Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов в ВЖ оценивали с помощью спонтанного НСТ-теста [Маянский А.Н., 1989];

в) Определение миелопероксидазы лейкоцитов проводили методом Грэхема–Кнолля [Яковенко Г.И., 1981].

4. Нефелометрические методы:

а) Определение активности лизоцима [Бухарин О.В., 1971];

б) Определение активности каталазы [Королюк М.А., 1988].

5. Иммунологический метод: содержание секреторного иммуноглобулина А (sIgA) определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле по Mancini et al. [Петров Р.В., 1997].

6. Определяли водородный показатель ВЖ.

7. Бактериологическое исследование осуществляли традиционным методом, производя посев материала на стандартный набор питательных сред. Культивировали микроорганизмы в аэробных и микроаэрофильных условиях. Видовую идентификацию проводили с использованием тест-систем и общепринятыми методами, согласно приказам МЗ СССР (Приказ № 535, 1985), используя номенклатуру Берджи, и сведения, обобщенные в руководствах по клинической микробиологии.

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Для каждой выборки вычислялось среднее, стандартное отклонение. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении переменных проверка гипотезы о равенстве выборочных средних выполнялась с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости

$p < 0,05$. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа анамнестических данных пациентов было выявлено, что воспалительные заболевания органов малого таза (эндометрит, сальпингит, tuboовариальный абсцесс) у женщин, страдающих ВК, встречались в 5 раз чаще, у пациентов с НВ – в 3,2 раза чаще, у больных БВ – в 7,1 раза чаще, чем у клинически здоровых женщин.

Наибольший процент инфекций, передаваемых половым путем (гонорея, трихомонадная инфекция, хламидиоз), был отмечен в анамнезе пациентов, страдающих ВК (44,4%) и НВ (40,1%), где эти заболевания ранее встречались примерно в 4 раза чаще, чем в группе здоровых лиц.

Микоплазмозы в большем % случаев обнаруживались у больных БВ (57,1%). Функциональные кисты яичников чаще встречались у больных ВК (22,2%) и у лиц с БВ (28,5%).

Таким образом, у женщин, страдающих ВК, НВ и БВ, частота патологий женской половой сферы встречалась в большем числе случаев, чем у женщин группы сравнения. Наиболее высокий процент перенесенных ранее инфекций, передаваемых половым путем, отмечался у больных ВК и НВ. У пациентов с БВ в анамнезе воспалительные заболевания органов малого таза, микоплазмозы встречались в большем проценте случаев.

Морфофункциональная характеристика эпителиальных клеток слизистой оболочки влагалища. Цитологические исследования клеточного осадка отделяемого слизистой оболочки влагалища показали, что наиболее выраженные деструктивные изменения вагинального эпителия обнаруживались у больных БВ (табл. 1).

Полученные результаты можно объяснить длительным воздействием повреждающих факторов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) – экзотоксинов, липопротеиназ, гиалуронидазы и др. – на структуру эпителиоцитов, приводящим к изменению слизистой оболочки: нарушению фаз клеточного обновления и замещению нормальных эпителиоцитов функционально

неполноценными. Подтверждением этому является и проведенный корреляционный анализ, при котором была обнаружена прямая корреляция степени деструкции вагинальных эпителиоцитов от количества *C.albicans* ($r=0,68$, $p<0,05$), *Streptococcus spp.* ($r=0,50$, $p<0,05$) и *G.vaginalis* ($r=0,79$, $p<0,05$). Это указывает на то, что субстанции этих микроорганизмов определяют степень цитотоксичности среды, что приводит к более значительной деструкции эпителия, причем роль *G.vaginalis* в этом процессе более выражена.

Таблица 1

Степень деструкции эпителиальных клеток вагинальной жидкости ($\bar{X} \pm s$)

Группы пациентов	Количество эпителиальных клеток, %				
	Деструкция 0 класса	Деструкция 1 класса	Деструкция 2 класса	Деструкция 3 класса	Деструкция 4 класса
Здоровые женщины (n = 20)	89,55±3,01	7,84±0,45	1,05±0,09	1,06±0,07	0,50±0,07
Больные вагинальным кандидозом (n = 18)	61,40±3,98 $p_1<0,05$	15,45±0,96 $p_1<0,05$	17,01±1,22 $p_1<0,05$	5,03±1,24 $p_1<0,05$	1,11±0,14 $p_1<0,05$
Больные неспецифическим вагинитом (n=25)	60,05±3,32 $p_1<0,05$	34,07±0,69 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	3,31±0,09 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	2,05±0,08 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	0,51±0,06 $p_2<0,05$
Больные бактериальным вагинозом (n = 14)	34,29±2,11 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$	23,46±0,78 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$	19,67±1,20 $p_1<0,05$ $p_3<0,05$	20,12±2,02 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$	2,46±0,28 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$

Примечание: p_1 – достоверность различий показателей по сравнению со здоровыми женщинами; p_2 – достоверность различий показателей по сравнению с больными вагинальным кандидозом; p_3 – достоверность различий показателей по сравнению с больными неспецифическим вагинитом.

Морфофункциональная характеристика клеток лейкоцитарного ряда в вагинальной жидкости. Проведенные цитологические и цитохимические исследования показали, что у женщин с ВК в ВЖ общее количество лейкоцитов было в 4 раза больше ($8,82 \pm 0,39 \cdot 10^9/\text{л}$, $p<0,05$), чем в группе контроля. У больных ВК степень жизнеспособности лейкоцитов (СЖЛ) достигала

48,33±3,42%, что в 6,4 раза больше, чем у здоровых лиц (табл. 2). Активность миелопероксидазы лейкоцитов (АМЛ) у больных ВК имела достоверно более низкие значения (1,41±0,05 усл.ед., $p<0,05$), чем у здоровых женщин. Процент активных нейтрофилов у больных ВК был в 1,4 раз больше (24,23±1,06%, $p<0,05$), а цитохимический индекс НСТ-теста – в 2 раза выше (2,24±0,10%, $p<0,05$), чем у клинически здоровых лиц.

У женщин, страдающих НВ, общее число лейкоцитов было в 2 раза больше ($5,56\pm 0,31\cdot 10^9/\text{л}$, $p<0,05$), чем у здоровых женщин. СЖЛ у больных НВ в 6,6 раз (50,05±2,79%, $p<0,05$) превышала процент жизнеспособных лейкоцитов у здоровых лиц. АМЛ у пациентов с НВ была в 1,4 раза меньше (1,56±0,07 усл.ед.), чем у женщин контрольной группы. Процент активных нейтрофилов (НСТ-тест) у пациентов с НВ имел более высокие значения (23,11±1,14%, $p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Цитохимический индекс НСТ-теста у женщин с НВ (2,11±0,15 усл.ед., $p<0,05$) в 1,9 раз превышал аналогичный показатель (1,1±0,17 усл.ед) клинически здоровых лиц.

У женщин, страдающих БВ, общее число лейкоцитов было в 4,9 раза меньше ($0,54\pm 0,02\cdot 10^9/\text{л}$, $p<0,05$), чем у клинически здоровых пациентов. СЖЛ у женщин с БВ имела более низкие значения (1,4±0,25%, $p<0,05$), чем у пациентов других групп: на 6,10% меньше, чем в группе контроля, на 46,93% меньше, чем у больных ВК и на 48,65% ниже, чем у лиц с НВ. АМЛ у больных БВ была в 2 раза меньше (1,07±0,05 усл.ед., $p<0,05$), чем в контроле. Процент активных нейтрофилов (НСТ-тест) у больных БВ был в 3,4 раза меньше (5,12±0,48%, $p<0,05$), чем у клинически здоровых женщин. Цитохимический индекс НСТ-теста у больных БВ (0,76±0,07 усл.ед., $p<0,05$) был в 1,4 раза ниже аналогичного показателя здоровых лиц.

Выраженная лейкоцитарная реакция при ВК и НВ возможно обусловлена способностью грибов к глубокому проникновению в слой эпителия и высоким токсическим действием кокко-бациллярной УПМ, способствующих возникновению данных заболеваний [Лебедева Т.И., 2004, Анкирская А.С., 2006].

Подтверждением этому является прямая корреляционная зависимость абсолютного числа лейкоцитов в ВЖ от количества *S.albicans* ($r=0,79$, $p<0,05$), *Streptococcus spp.* ($r=0,67$, $p<0,05$) и *E.coli* ($r=0,77$, $p<0,05$). Зарегистрированная отрицательная корреляционная связь абсолютного числа лейкоцитов от количеством *Lactobacillus*

spp. ($r=-0,55$, $p<0,05$). Это указывает на то, что выраженная местная лейкоцитарная реакция при ВК и НВ индуцируется *S.albicans*, *Streptococcus* spp. и *E.coli*, а не *Lactobacillus* spp.

Таблица 2

Морфофункциональные показатели лейкоцитов в вагинальной жидкости
($\bar{X} \pm s$)

Показатели	Группы пациентов			
	Здоровые женщины (n = 20)	Больные вагинальным кандидозом (n = 18)	Больные неспецифическим вагинитом (n = 25)	Больные бактериальным вагинозом (n = 14)
Общее количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$	2,67±0,23	8,82±0,39 $p_1<0,05$	5,56±0,31 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	0,54±0,02 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$
Количество сегментоядерных нейтрофилов, $10^9/\text{л}$	2,32±0,21	6,75±0,46 $p_1<0,05$	4,08±0,27 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	0,54±0,02 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$
Степень жизнеспособности лейкоцитов, %	7,50±1,25	48,33±3,42 $p_1<0,05$	50,05±2,79 $p_1<0,05$	1,4±0,25 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$
Активность миелопероксидазы лейкоцитов, усл.ед.	2,25±0,06	1,41±0,05 $p_1<0,05$	1,56±0,07 $p_1<0,05$	1,07±0,05 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$
Количество активных нейтрофилов, %	17,67±1,12	24,23±1,06 $p_1<0,05$	23,11±1,14 $p_1<0,05$	5,12±0,48 $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$
Средний цитохимический индекс (НСТ-тест), усл.ед.	1,1±0,17	2,24±0,10 $p_1<0,05$	2,11±0,15 $p_1<0,05$	0,76±0,07 $p_1>0,05$ $p_2<0,05$ $p_3<0,05$

Примечание: p_1 – достоверность различий показателей по сравнению со здоровыми женщинами; p_2 – достоверность различий показателей по сравнению с больными вагинальным кандидозом; p_3 – достоверность различий показателей по сравнению с больными неспецифическим вагинитом.

Высокие показатели СЖЛ при ВК и НВ вероятно обусловлены не уменьшением их гибели, а притоком из кровеносного русла «свежих» клеток вследствие воспаления. Обнаруженная обратная корреляционная зависимость процентного содержания живых лейкоцитов от количества *S.albicans*, *Streptococcus* spp. ($r=-0,82$,

$p < 0,05$) и *E.coli* ($r = -0,72$, $p < 0,05$) указывает на то, что субстанции этих микроорганизмов определяют степень цитотоксичности среды.

При проведении корреляционного анализа зарегистрирована отрицательная корреляционная связь абсолютного количества лейкоцитов от количества *Lactobacillus spp.* ($r = -0,55$, $p < 0,05$) и *G.vaginalis* ($r = -0,34$, $p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что *G.vaginalis* способны затормаживать местные клеточные противоинфекционные реакции.

Результаты цитологического исследования отделяемого слизистой оболочки влагалища показали, что макрофаги были обнаружены только у пациентов с ВК ($1,06 \pm 1,91 \cdot 10^9/\text{л}$) и с НВ ($0,83 \pm 0,03 \cdot 10^9/\text{л}$) (рис.1).

При нефелометрической оценке активности лизоцима в отделяемом слизистой оболочки влагалища было обнаружено, что у женщин, страдающих ВК, активность лизоцима была в 1,7 раз ниже ($6,3 \pm 0,49$ мкг/мл, $p < 0,05$), у пациентов с НВ – в 1,9 раз меньше ($5,4 \pm 0,41$ мкг/мл, $p < 0,05$), у больных БВ ($2,1 \pm 0,91$ мкг/мл, $p < 0,05$) – в 5 раз меньше, чем у здоровых лиц.

Количество лимфоцитов в отделяемом слизистой оболочки влагалища у больных ВК в 3,2 раза больше ($1,05 \pm 0,09 \cdot 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$), чем у женщин контрольной группы и в 1,6 раз больше, чем у пациентов с НВ ($0,63 \pm 0,03 \cdot 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$). У больных БВ лимфоциты в вагинальном секрете выявлены не были.

Определение содержания sIgA в ВЖ методом радиальной иммунодиффузии в геле обнаружило, что у пациентов с ВК количество sIgA в ВЖ ($1,25 \pm 0,06$ г/л, $p < 0,05$) в 1,4 раза больше, а у лиц с НВ это значение ($1,09 \pm 0,04$ г/л, $p < 0,05$) в 1,3 раза выше аналогичного показателя клинически здоровых лиц. Для больных БВ было характерно низкое содержание sIgA ($0,41 \pm 0,03$ г/л, $p < 0,05$): в 2 раза меньше, чем у здоровых женщин.

Выявленные изменения могут быть обусловлены тем, что при ВК и НВ происходит активная миграция лимфоцитов из слизистой оболочки влагалища. Антигенпрезентирующие макрофаги стимулируют пролиферацию и дифференциацию В-лимфоцитов в антителообразующие плазмциты, которые осуществляют синтез sIgA. Дефицит sIgA в ВЖ у пациентов с БВ может быть следствием нарушения регенерации эпителиоцитов, ведущей к угнетению синтеза секреторного компонента и сборки sIgA. Длительное антигенное раздражение метаболитами *G.vaginalis*, а так же

способность гарднерелл оставаться нераспознанными собственной иммунной системой может приводить к угнетению локальной противомикробной защиты [Кубанова А.А., 1996, Klocker U., 2000].

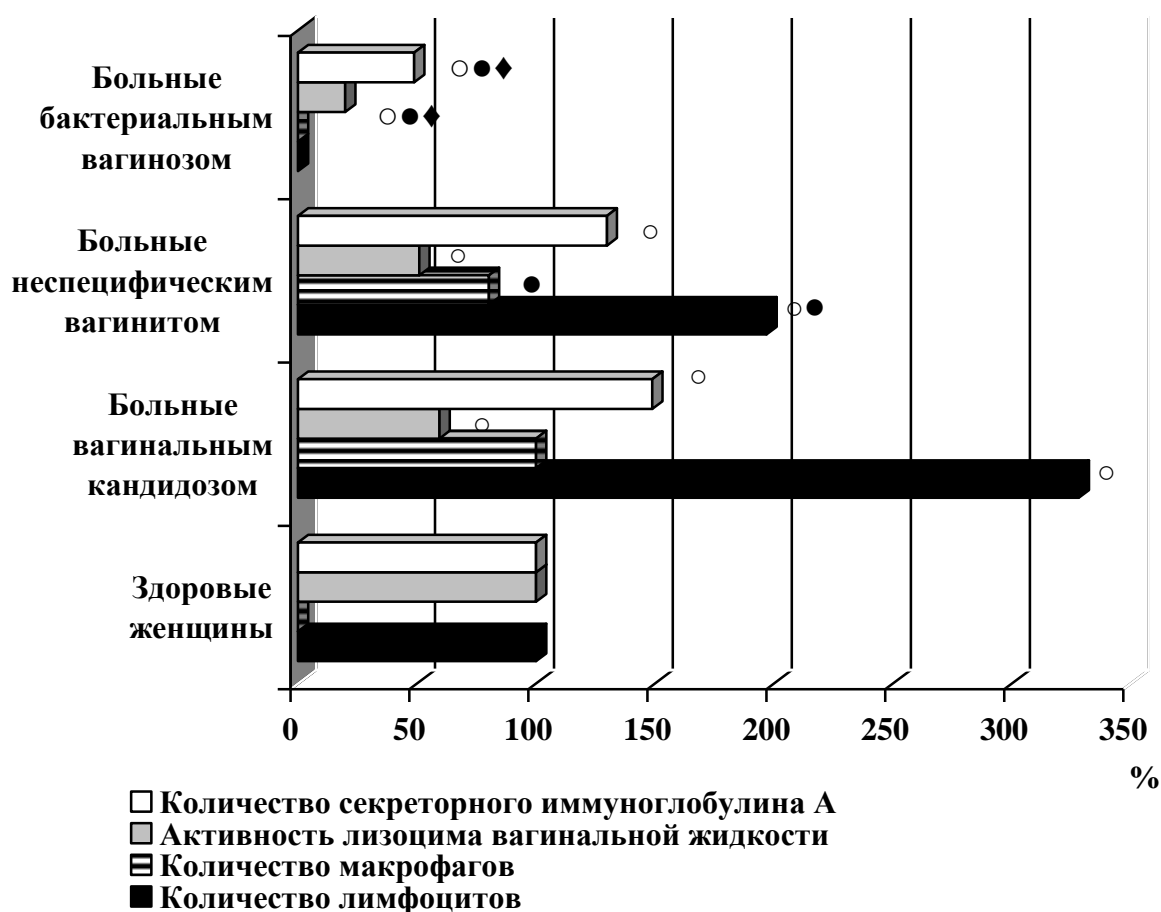


Рис. 1. Показатели морфофункционального состояния лимфоцитов и макрофагов отделяемого слизистой оболочки влагалища (○ – достоверность различий показателей по сравнению с контролем при $p < 0,05$; ● – достоверность различий показателей по сравнению с больными вагинальным кандидозом при $p < 0,05$; ◆ – достоверность различий показателей по сравнению с больными неспецифическим вагинитом при $p < 0,05$).

Подтверждением этому является установленная прямая корреляционная зависимость между содержанием sIgA от количества *Lactobacillus spp.* ($r=0,47$, $p < 0,05$), *Streptococcus spp.* ($r=0,49$, $p < 0,05$) и *E.coli* ($r=0,48$, $p < 0,05$). Это свидетельствует о способности данных микроорганизмов стимулировать реакции, приводящие к выработке sIgA. Содержание sIgA в отделяемом влагалища имело обратную корреляционную зависимость от количества *G.vaginalis* ($r=-0,66$, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о подавлении *G.vaginalis* секреции sIgA.

Таким образом, было обнаружено, что для женщин, страдающих ВК и НВ, характерны высокие показатели общего количества лейкоцитов, процента активированных лейкоцитов и их жизнеспособности, а так же концентрации sIgA. В то же время у женщин с ВК и НВ отмечалась низкая активность миелопероксидазы и лизоцима. При БВ изучаемые показатели, характеризующие клеточный и гуморальный факторы местной противoinфекционной защиты, имели наиболее низкие значения.

Морфофункциональное состояние эукариотических и прокариотических клеток микробного происхождения отделяемого слизистой оболочки влагалища. В ходе проведенного бактериологического исследования отделяемого слизистой оболочки влагалища у 10% клинически здоровых женщин были обнаружены эукариотические клетки микробного происхождения *S.albicans* в ВЖ в количестве $1,2 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл. У пациентов с ВК *S.albicans* выявлялись в 4,6 раз больше ($5,5 \pm 1,3$ lg КОЕ/мл, $p < 0,05$), чем у здоровых женщин. У 16% женщин с НВ *S.albicans* были обнаружены в титре $1,5 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл. У 21% женщин с БВ *S.albicans* были обнаружены в количестве $1,8 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл (рис.2).

Результаты бактериологического и бактериоскопического исследования ВЖ показали наличие у пациентов в отделяемом слизистой оболочки влагалища прокариотических бациллярных клеток: *Lactobacillus* spp., *E.coli* и *G.vaginalis*. Выделенные из ВЖ палочковидные УПМ оценивали на наличие у них вирулентных свойств – гемолитической активности (рис. 3).

У женщин, страдающих ВК, *Lactobacillus* spp. были обнаружены в количестве на 30,8% меньшем ($4,5 \pm 0,9$ lg КОЕ/мл, $p < 0,05$), чем у здоровых лиц. У больных НВ *Lactobacillus* spp. были выявлены в 20% случаев, их титр был в 3 раза был ниже ($2,1 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл, $p < 0,05$), чем аналогичный показатель в группе контроля. У пациентов, страдающих БВ, *Lactobacillus* spp. не были обнаружены.

E.coli у 16,5% больных ВК выявлялись в количестве $1,3 \pm 0,7$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза составляла $2,45 \pm 0,15$ мм). У пациентов, страдающих НВ, *E.coli* выявлялась в 20% случаев в количестве $3,1 \pm 0,7$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $2,51 \pm 0,17$ мм). В культуральных посевах женщин с БВ *E.coli* отсутствовала.

G. vaginalis выявлялась только у женщин с БВ в титре $5,7 \pm 1,0$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $2,42 \pm 0,15$ мм).

В результате проведенных исследований в ВЖ были обнаружены кокковые бактериальные клетки: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. (рис. 2). Выделенные микроорганизмы подвергали оценке их биологических свойств с целью определения степени вирулентности: наличие лецитиназной, плазмокоагуляционной и гемолитической активности (рис. 3).

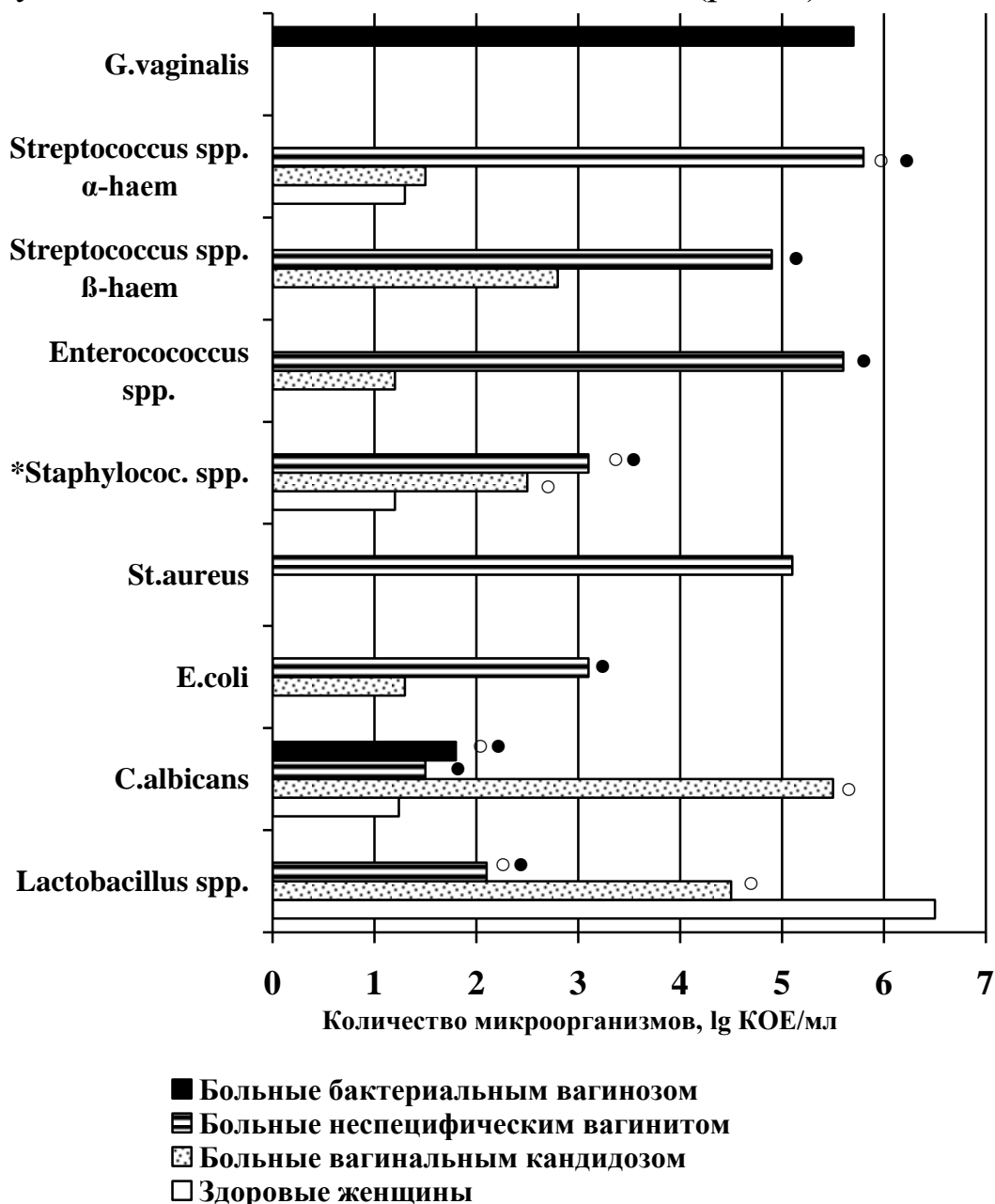


Рис. 2. Содержание эукариотических и прокариотических бактериальных клеток в отделяемом слизистой оболочки влагалища (**Staphylococcus* spp. – коагулазонегативные стафилококки; ○ – достоверность различий по сравнению со здоровыми женщинами при $p < 0,05$; ● – достоверность различий по сравнению с больными вагинальным кандидозом).

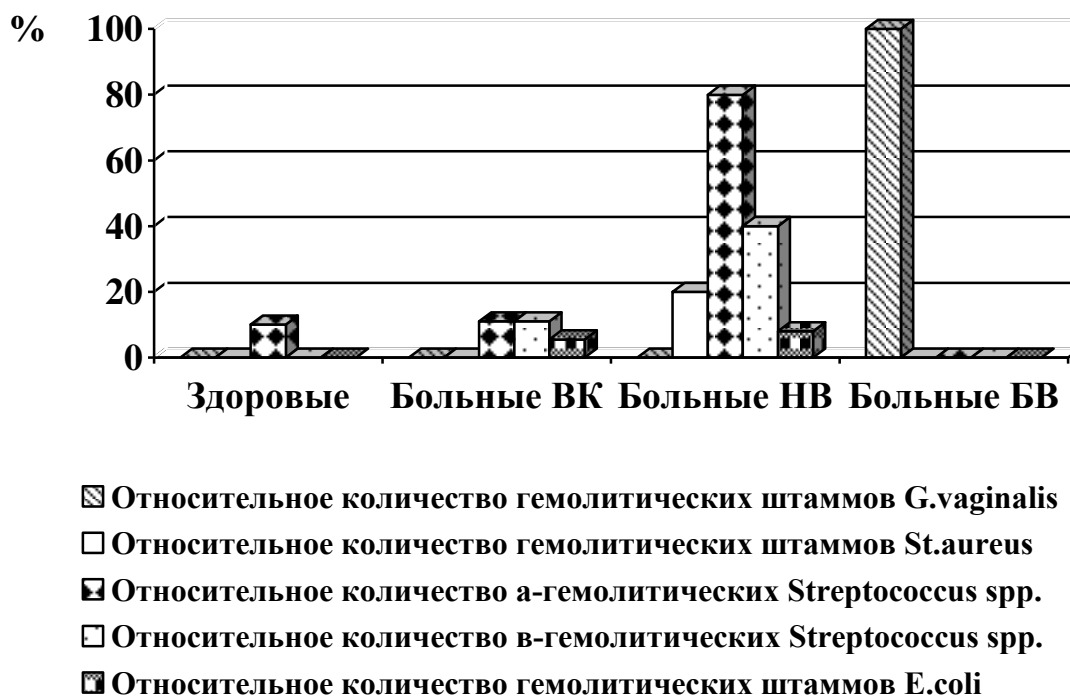


Рис. 3. Биологические свойства прокариотических клеток отделяемого слизистой оболочки влагалища у женщин с оппортунистическими вагинальными инфекциями (ВК – вагинальный кандидоз; НВ – неспецифический вагинит; БВ – бактериальный вагиноз).

У 25% клинически здоровых женщин выявлялись коагулазонегативные стафилококки ($1,2 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл), не обладавшие гемолитической, плазмокоагулазной и лецитиназной активностью. У 10% здоровых лиц – α-гемолитические *Streptococcus spp.* в титре $1,3 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза $1,22 \pm 0,10$ мм).

У 11% больных ВК были обнаружены коагулазонегативные стафилококки в титре на 50% большем ($2,5 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл, $p < 0,05$), чем у здоровых женщин (зона гемолиза – $1,76 \pm 0,12$ мм). У 22% пациентов с ВК обнаруживались *Enterococcus spp.* в количестве $1,2 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $2,08 \pm 0,13$ мм.), у 11% – α-гемолитические *Streptococcus spp.* в титре $1,5 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $1,32 \pm 0,12$ мм) и β-гемолитические *Streptococcus spp.* в количестве $2,8 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $1,89 \pm 0,14$ мм).

У женщин с НВ выявлялись коагулазонегативные стафилококки в количестве $3,1 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $1,81 \pm 0,14$ мм), что было в 2,6 раза больше, чем у женщин контрольной группы. У 20% пациентов с НВ были выявлены *Enterococcus spp.* в титре $5,6 \pm 0,5$ lg КОЕ/мл с зоной гемолиза – $2,10 \pm 0,13$ мм. У этой группы обследуемых обнаруживались α-гемолитические *Streptococcus spp.* в

титре $5,8 \pm 0,6$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $1,49 \pm 0,11$ мм) и β -гемолитические *Streptococcus* spp. в титре $4,9 \pm 0,5$ lg КОЕ/мл (зона гемолиза – $2,31 \pm 0,11$ мм). У 20% лиц с НВ выявлялся *St.aureus* ($5,1 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл), все штаммы которого проявляли гемолитические свойства (зона гемолиза – $3,10 \pm 0,15$ мм), лецитиназную ($3,56 \pm 0,12$ мм) и плазмокоагулазную активность ($2,38 \pm 0,09$ ч).

У женщин, страдающих БВ, аэробные кокковые бактериальные клетки в отделяемом слизистой оболочки влагалища отсутствовали.

Полученные данные могут быть обусловлены тем, что при снижении колонизационной резистентности происходит гиперпродукция УПМ, которые, конкурируя за сайты прикрепления эпителиоцитов, проявляют вирулентные свойства, частично или полностью вытесняя лактобактерии. Подтверждением этому является обнаруженная обратная корреляционная зависимость между количеством *Lactobacillus* spp., с одной стороны, процентом выявления *C.albicans* ($r=-0,59$, $p<0,05$), *Streptococcus* spp. ($r=-0,81$, $p<0,05$) и *E.coli* ($r=-0,61$, $p<0,05$), с другой стороны. Это указывает на антагонизм этих представителей вагинальной микрофлоры.

Таким образом, дисбиотические изменения микробиоценоза влагалища у больных ВК и НВ характеризовались подавлением *Lactobacillus* spp., колонизацией слизистой влагалища *C.albicans* и кокко-бациллярной УМП, обладавшей признаками вирулентности (гемолитической, лецитиназной, плазмокоагулазной активностью). У женщин с БВ *Lactobacillus* spp. и кокко-бациллярная аэробная УПМ отсутствовали, у части лиц обнаруживались *C.albicans*, *G.vaginalis* обладала гемолитической активностью.

Активность каталазы и водородный показатель вагинальной жидкости. Исследования активности каталазы (АК) и рН отделяемого слизистой оболочки влагалища позволили установить, что у больных вагинальным кандидозом АК была в 2 раза больше ($98,6 \pm 4,41$ мкат/л, $p<0,05$), чем у клинически здоровых лиц. Водородный показатель ВЖ у женщин с ВК был на 21% меньше ($pH=3,25 \pm 0,06$, $p<0,05$), чем аналогичный показатель у здоровых лиц (рис. 4).

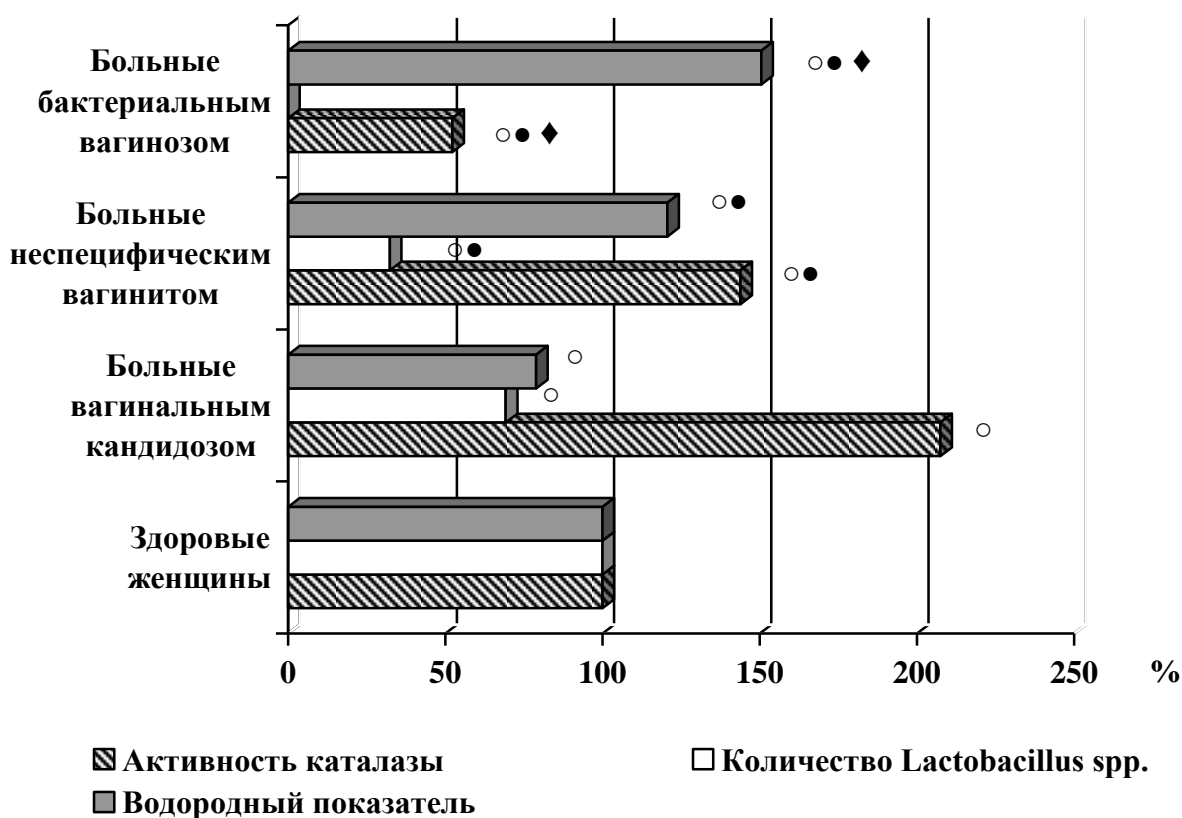


Рис. 4. Показатели местной противoinфекционной защиты в вагинальной жидкости (○ – достоверность различий показателей по сравнению со здоровыми женщинами при $p < 0,05$; ● – достоверность различий показателей по сравнению с больными вагинальным кандидозом при $p < 0,05$; ◆ – достоверность различий показателей по сравнению с больными неспецифическим вагинитом при $p < 0,05$).

АК у больных НВ ($68,37 \pm 2,64$ мкат/л, $p < 0,05$) в 1,4 раза превышала аналогичное значение у здоровых женщин. Водородный показатель отделяемого слизистой влагалища у больных НВ ($pH = 4,97 \pm 0,08$, $p < 0,05$) был на 16,4% больше аналогичного значения в контрольной группе. У пациентов, страдающих БВ, отмечались наиболее низкие значения АК ($24,83 \pm 1,31$ мкат/л, $p < 0,05$) по сравнению с аналогичными параметрами в группе здоровых женщин, у больных ВК и НВ. РН отделяемого влагалища у женщин с БВ ($pH = 6,20 \pm 0,15$, $p < 0,05$) в 1,5 раз больше, чем у здоровых лиц.

Такие результаты могут быть обусловлены тем, что при ВК и НВ лактобактерии, грибы и аэробные УПМ обеспечивают выработку каталазы, которая предотвращает действие перекиси водорода, вырабатываемой перекись-продуцирующими лактобактериями.

Низкая активность каталазы при БВ вероятно обусловлена отсутствием лактобактерий и аэробной УПМ и, как следствие, сниженной антиоксидантной защитой ПЭС влагалища [Сергеев А.Ю., 2003; Степанькова Е.А., 2007].

Увеличение рН в отделяемом слизистой оболочки влагалища при НВ и БВ может быть следствием снижения (отсутствия) *Lactobacillus spp.*, вырабатывающих молочную и другие жирные кислоты. Метаболиты анаэробов и *G.vaginalis*, образующиеся в процессе маслянокислого и пропионопислого анаэробного брожения, способствуют защелачиванию среды [Анкирская А.С., 2000]. Снижение рН у пациентов с ВК связано со способностью *S.albicans* усваивать аммиачный и органический азот в среде обитания [Домарадский И.В., 2007].

Изменения морфофункционального состояния слизистой влагалища при данных патологиях обуславливают снижение колонизационной резистентности и нарушение местного иммунитета слизистой влагалища. Это может способствовать увеличению риска присоединения других инфекций урогенитального тракта.

ВЫВОДЫ

1. Для пациентов с неспецифическим вагинитом, вагинальным кандидозом и бактериальным вагинозом характерны изменения морфофункционального состояния клеток вагинальной жидкости, характеризующиеся высокими показателями деструкции эпителиоцитов. Наиболее выражена деструкция эпителия у пациентов с бактериальным вагинозом.
2. У женщин с неспецифическим вагинитом и вагинальным кандидозом обнаружена выраженная лейкоцитарная реакция с высокой жизнеспособностью клеток и дисбалансом их функциональной активности (высокие показатели кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и биосинтеза секреторного иммуноглобулина А, низкие значения лизоцима). У женщин с бактериальным вагинозом отмечается подавление функциональной активности лейкоцитов и лимфоцитов: низкие показатели фагоцитарной способности нейтрофилов, угнетение продукции лизоцима и подавление секреции иммуноглобулина А.
3. Низкий уровень миелопероксидазы лейкоцитов у всех больных с оппортунистическими вагинальными инфекциями и активности

каталазы вагинальной жидкости у пациентов с бактериальным вагинозом указывают на угнетение факторов антиоксидантной защиты при данных патологиях.

4. Дисбаланс прокариотических и эукариотических клеток в вагинальной жидкости больных оппортунистическими вагинальными инфекциями проявляется замещением индигенной флоры условно-патогенными микроорганизмами, проявляющими гемолитические, лецитиназные и плазмокоагулазные свойства.
5. Наиболее индикаторными показателями оценки состояния колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища при вагинальном кандидозе, неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе являются степень деструкции эпителиоцитов, количество лейкоцитов, микробный статус, активность каталазы, рН, уровень секреторного иммуноглобулина А в вагинальной жидкости.
6. При взаимодействии эукариотических и прокариотических клеток отделяемого влагалища у пациентов с оппортунистическими вагинальными инфекциями метаболиты условно-патогенных микроорганизмов способствуют повреждению вагинального эпителия, снижению функциональной способности лейкоцитов и лимфоцитов, что приводит к подавлению местного иммунитета.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Теровская, Т.Ю. Морфофункциональное состояние отделяемого клеток влагалища при бактериальном вагинозе и вагинитах у женщин, проживающих в городе Северске [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.Н., Алпатова Н.И. // Науки о человеке: материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов / Сибирский гос.мед.ун-т. – Томск, 2006. – С.92-93.

2. Теровская, Т.Ю. Колонизационная резистентность слизистой влагалища у женщин с доброкачественными опухолями в анамнезе [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.Н., Алпатова Н.И. // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Прилож. 1. –С.172-173.

3. Теровская, Т.Ю. Оппортунистические вагинальные инфекции у жительниц города Северска [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.Н., Алпатова Н.И. // Науки о человеке: материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов / Сибирский гос.мед.ун-т. – Томск, 2007. – С.161-163.

4. Теровская, Т.Ю. Клинико-лабораторные исследования при дисбиозе влагалища [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.Н., Алпатова Н.И. // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы лучевой, функциональной и лабораторной диагностики». - Северск, 2007. – С. 76-78.

5. Теровская, Т.Ю. Состояние противoinфекционной защиты слизистой оболочки влагалища при вагинальном кандидозе [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.Н., Алпатова Н.И. // Науки о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов / Сибирский гос.мед.ун-т. – Томск, 2008. – С.77-78.

6. Теровская, Т.Ю. Факторы кислородзависимой бактерицидности вагинальной жидкости при неспецифическом вагините и бактериальном вагинозе [Текст] / Теровская Т.Ю., Красноженов Е.П. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23., № 3. – вып.1. – С. 120-121.

7. Теровская, Т.Ю. Колонизационная резистентность репродуктивного тракта женщин при оппортунистических вагинальных инфекциях [Текст] / Теровская Т.Ю. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23., № 3. – вып.1. – С.120.

8. Теровская, Т.Ю. Состояние факторов местной противoinфекционной защиты при оппортунистических вагинальных инфекциях [Текст] / Теровская Т.Ю., Ахременко Я.А., Красноженов Е.П. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2008. – № 4. – С. 24-26.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК	активность каталазы
АЛ	активность лизоцима
АМЛ	активность миелопероксидазы лейкоцитов
БВ	бактериальный вагиноз
ВЖ	вагинальная жидкость
ВК	вагинальный кандидоз
НВ	неспецифический вагинит
ОВИ	оппортунистические вагинальные инфекции
СЖЛ	степень жизнеспособности лейкоцитов
sIgA	секреторный иммуноглобулин А
УПМ	условно-патогенная микрофлора

Тираж 100. Заказ № 1054.
Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники
634050, г. Томск, пр. Ленина, 40.
Тел.: 53-30-18.