



# Микробиоценоз и локальный иммунитет слизистой оболочки влагалища у девочек в раннем детстве: норма и патология

Е. В. Уварова<sup>1</sup>, З. К. Батырова<sup>1</sup>, З. Х. Кумыкова<sup>1</sup>, А. Е. Донников<sup>1</sup>, О. В. Бурменская<sup>1</sup>, Л. С. Намазова-Баранова<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup> Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, г. Москва

<sup>2</sup> Научный центр здоровья детей, г. Москва

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, г. Москва

**Цель исследования:** оценить особенности микробиоценоза и локального иммунитета слизистой оболочки влагалища у девочек в периоде раннего детства с рецидивом сращения малых половых губ, с острым бактериальным вульвовагинитом и с атопическим дерматитом в сравнении со здоровыми сверстницами.

**Материалы и методы.** В исследование включили 217 девочек в возрасте от 1 до 36 месяцев: 68 — с острым бактериальным вульвовагинитом, 60 — с рецидивом сращения малых половых губ, 27 — с атопическим дерматитом и 62 здоровых девочек без отклонений физического и полового развития, составивших контрольную группу. Всем участницам проведено количественное молекулярно-генетическое исследование соскобов эпителия преддверия и стенки влагалища с анализом микробного представительства (с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени) и локального иммунитета.

**Результаты.** В структуре общей бактериальной массы микробиоценоза девочек раннего возраста наиболее часто выявляли группы таких анаэробных микроорганизмов, как *Eubacterium spp.*, *Prevotella bivia*/*Porphyromonas spp.*, *Megasphaera spp.*/*Velionella spp.*/*Dialister*, *Peptostreptococcus spp.* У девочек со сращением малых половых губ также часто (примерно в 1,2 раза чаще, чем у здоровых) находили *Mobiluncus spp.*/*Corynebacterium spp.* (100% против 83%;  $p = 0,018$ ). В группе с острым вульвовагинитом в 2,6 раза реже, чем в контроле, обнаруживали геномы *Enterococcus* (27,3% против 72,3%;  $p = 0,014$ ) и в 3,2 раза реже — *Gardnerella vaginalis* (18,2% против 59,6%;  $p = 0,033$ ). При этом соотношение *Lactobacillus spp.* и *G. vaginalis* было увеличено за счет преобладания геномов *Lactobacillus spp.* У девочек с атопическим дерматитом количество геномов *G. vaginalis* было в 3,2 раза ( $p = 0,001$ ), а *Lactobacillus spp.* — в 2,4 раза ( $p = 0,002$ ) меньше, чем в группе контроля. Однако количественные значения всех выявленных групп микроорганизмов не имели значимых различий у обследованных девочек с патологиями.

Локальный иммунитет слизистой оболочки влагалища у участниц с рецидивом сращения малых половых губ характеризовался сниженным содержанием как провоспалительных (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10, ИЛ-12 $\alpha$ ), так и противовоспалительных (ИЛ-18) цитокинов, уровней экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) трансформирующего фактора роста  $\beta$  и фактора некроза опухоли  $\alpha$ . При вульвовагините в образцах обнаружено повышение экспрессии мРНК гена CD45 в 1,7 раза и снижение таковой ИЛ-18 в 1,9 раза, а у девочек с атопическим дерматитом — уменьшение экспрессии ИЛ-8, ИЛ-10 и мРНК гена CD45 в сравнении со здоровыми сверстницами.

**Заключение.** Рецидивирующее сращение малых половых губ у девочек раннего возраста не связано с острым воспалительным процессом инфекционной этиологии. Групповое представительство микроорганизмов на слизистой оболочке влагалища у девочек раннего возраста характеризуется динамичным изменением качественного состава различных их групп. Возможно, баланс микробиологического сообщества влагалища у таких девочек сохраняется за счет присутствия определенных групп микроорганизмов при их минимальных количественных значениях. При этом немаловажную регулирующую роль играют *G. vaginalis* с определенными минимальными количественными показателями.

**Ключевые слова:** раннее детство, молекулярно-генетические методы, микробиоценоз, локальный иммунитет, атопический дерматит, сращения малых половых губ, вульвовагинит.

## Microbiota and Local Immunity of Vaginal Mucosa in Very Young Girls: Normal and Abnormal Parameters

Ye. V. Uvarova<sup>1</sup>, Z. K. Batyrova<sup>1</sup>, Z. Kh. Kумыkova<sup>1</sup>, A. Ye. Donnikov<sup>1</sup>, O. V. Burmenskaya<sup>1</sup>, L. S. Namazova-Baranova<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup> V. I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

<sup>2</sup> Scientific Centre for Children's Health, Moscow

<sup>3</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

<sup>4</sup> N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

**Study Objective:** To describe the microbiota and local immunity of the vaginal mucosa in very young girls with recurrent labial adhesions, acute bacterial vulvovaginitis, or atopic dermatitis, compared to age-matched healthy girls.

**Materials and Methods:** The study included 217 girls, aged one to 36 months: 68 with acute bacterial vulvovaginitis, 60 with recurrent labial adhesions, 27 with atopic dermatitis, and 62 healthy girls with no abnormalities in physical or sexual development (control group). Quantitative molecular genetic analysis was performed on epithelial scrapes of the vaginal vestibule and vaginal wall obtained from all participants, to assess microbial composition (using real-time polymerase chain reaction) and local immunity.

**Study Results:** The following groups of anaerobic microorganisms were the most commonly observed components of the bacterial microbiota in very young girls: *Eubacterium spp.*, *Prevotella bivia*/*Porphyromonas spp.*, *Megasphaera spp.*/*Velionella spp.*/*Dialister*, and *Peptostreptococcus spp.* Girls with labial adhesions frequently (about 1.2 times more so than healthy girls) had *Mobiluncus spp.*/*Corynebacterium spp.* (100% vs. 83%;  $p = 0.018$ ). In girls with acute vulvovaginitis, the *Enterococcus* and *Gardnerella vaginalis* genomes were found less frequently by factors of 2.6 (27.3% vs. 72.3%;  $p = 0.014$ ) and 3.2 (18.2% vs. 59.6%;  $p = 0.033$ ), respectively, than in the control group. The *Lactobacillus spp.*/*G. vaginalis* ratio was elevated because of a greater percentage of *Lactobacillus spp.* genomes. In the group of girls with atopic dermatitis, the *G. vaginalis* and *Lactobacillus spp.* genomes were found less frequently by factors of 3.2 ( $p = 0.001$ ) and 2.4 ( $p = 0.002$ ), respectively, than in the control group. There were no significant differences, however, in the quantity of any the groups of microorganisms studied, between the groups of girls with different health problems.



In participants with recurrent labial adhesions the following changes were observed in local immunity of the vaginal mucosa: lower levels of both pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-10, and IL-12 $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-18) cytokines and lower expression of messenger ribonucleic acid (mRNA), transforming growth factor  $\beta$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$ . Changes observed in samples taken from girls with vulvovaginitis included a 1.7 times higher expression of CD45 mRNA and an expression of IL-18 that was lower by a factor of 1.9 than in the control group. Girls with atopic dermatitis had lower expression of IL-8, IL-10, and CD45 mRNA than the age-matched healthy controls.

**Conclusion:** Recurrent labial adhesions in very young girls are not associated with acute inflammation of infectious origin. The qualitative composition of the microbiota of the vaginal mucosa in this age population changes over time, with shifts being observed in different groups of organisms. It is possible that the balance of vaginal microbiota in these girls is maintained by the presence of certain groups of microorganisms in very low quantities. Low quantities of *G. vaginalis* also play an important regulatory role.

**Keywords:** early childhood, molecular genetic techniques, microbiota, local immunity, atopic dermatitis, labial adhesions, vulvovaginitis.

В последнее десятилетие зафиксирован заметный рост частоты (до 38%) сращения малых половых губ у девочек в возрасте до 3 лет [1, 2]. Несмотря на то что публикации о различных заболеваниях вульвы широко представлены в российской и зарубежной печати, сведения о тактике ведения девочек со сращением малых половых губ практически единичны. Диагностические мероприятия у них зачастую ограничиваются гинекологическим осмотром, что затрудняет дифференцированный подход и стандартизацию лечения. В результате при выборе метода терапии имеет место необоснованная полипрагмазия.

Среди факторов риска сращения малых половых губ одни авторы основное значение отводят воспалительным заболеваниям вульвы и влагалища инфекционной природы [3–6], другие — аллергическим заболеваниям (атопическому дерматиту) [7–9], третьи — сочетанному воздействию факторов [10, 11].

Девочки, уже умеющие говорить, жалуются на боль в области промежности и внизу живота. Родителей беспокоит, что их ребенок сильно тужится при микции, стал раздражительным, плаксивым. У младенцев нередко повышается температура тела, нарушаются сон, аппетит, особенно в результате острой задержки мочи при полном закрытии половой щели. Вышеуказанное послужило причиной выбора в качестве **цели исследования** сравнительную оценку особенностей микробиоценоза и локального иммунитета слизистой оболочки влагалища у девочек в периоде раннего детства с рецидивом сращения малых половых губ, с острым вульвовагинитом, атопическим дерматитом и у здоровых сверстниц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С октября 2009 г. по 2012 г. было проведено одномоментное когортное исследование по результатам клиничко-лабораторного обследования 217 девочек в возрасте от 1 месяца до 3 лет включительно.

В исследование включили 68 девочек с острым бактериальным вульвовагинитом, 60 — с рецидивом сращения малых половых губ, 27 — с атопическим дерматитом

(основная группа) и 62 здоровых девочек без отклонений физического и полового развития (контрольная группа).

Критерием включения в основную группу стало наличие изолированного патологического состояния вульвы: 1) рецидива частичного или сплошного сращения малых половых губ; 2) клинически и лабораторно подтвержденного воспаления вульвы и влагалища инфекционного генеза (вульвовагинита); 3) клинически подтвержденного атопического дерматита. Критерии включения в группу контроля: 1) подтвержденное клинически и лабораторно соматическое и гинекологическое здоровье; 2) отсутствие сращения малых половых губ в анамнезе и на момент включения в исследование.

Сбор клиничко-анамнестических данных и взятие биоматериала осуществляли в научно-поликлиническом отделении и во втором гинекологическом отделении ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России, а также в консультативно-диагностическом центре ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России.

Лабораторное исследование проводилось в лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова».

Биоматериал с внутренней поверхности основания малых половых губ и с боковой стенки влагалища за гименом получали путем деликатного соскоба эпителия с помощью одноразового универсального урогенитального зонда (ЗГУ-ЦМ, Россия) с последующим переносом содержимого соскобов в пробирки с транспортной средой.

Для выделения ДНК микроорганизмов из полученного биоматериала использовали наборы «Проба-ГС» («ДНК-Технология», Россия). Показателем адекватности получения биоматериала служило количество геномной ДНК эпителиальных клеток, попавших в пробу. Количество взятого материала оценивали в абсолютных числах, за минимальный пороговый уровень принимали значение 10<sup>4</sup> (log 4). Лабораторный контроль взятого материала после анализа его количества был валиден во всех случаях.

Батырова Залина Кимовна — к. м. н., научный сотрудник второго гинекологического отделения (детского и юношеского возраста) ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: linadoctor@mail.ru

Бурменская Ольга Владимировна — д. б. н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: o\_bourmenskaya@oparina4.ru

Донников Андрей Евгеньевич — к. м. н., врач лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: a\_donnikov@oparina4.ru

Кумыкова Заира Хасановна — к. м. н., старший научный сотрудник второго гинекологического отделения (детского и юношеского возраста) ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: zai-kutykova@yandex.ru

Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна — академик РАН, д. м. н., профессор, заместитель директора по научной работе, директор Научно-исследовательского института педиатрии ФГАУ НЦЗД Минздрава России; заведующая кафедрой аллергологии и клинической иммунологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России; заведующая кафедрой факультетской педиатрии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России. 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1. E-mail: namazova@nczd.ru

Уварова Елена Витальевна — д. м. н., профессор, заведующая вторым гинекологическим отделением (детского и юношеского возраста) ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: elena-ivarova@yandex.ru

При количественной оценке биоценоза влагалища (набор «Фемофлор», «ДНК-Технология») учитывали общую бактериальную массу, массу *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium* и основных групп микроорганизмов, представляющих условно-патогенную микрофлору, с включением *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Prevotella bivia*/*Porphyromonas*, *Sneathia spp.*/*Leptotrihia spp.*/*Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp.*/*Veilonella spp.*/*Dialister spp.*, *Lachnobacterium spp.*/*Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp.*/*Corynebacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, *Candida spp.* Помимо стандартного набора групп микроорганизмов «Фемофлор-16», образцы исследовали на наличие абсолютных патогенов: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*. Амплификацию осуществляли путем ПЦР в режиме реального времени. Количество ДНК рассчитывали в логарифмах геномных эквивалентов микроорганизмов в конкретном образце (log/ГЭ/образец). Обработка результатов осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения к приборам.

Для уточнения состояния местного иммунитета в забранных образцах определяли содержание транскриптов ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12α, ИЛ-18, ИФН-γ, ТФР-β, а также общий лейкоцитарный антиген CD45.

Во избежание деградации мРНК полученный биоматериал помещали в пробирки с раствором гуанидинтиоцианата (лизирующий раствор набора «Проба-НК», «ДНК-Технология»). В работе использовали коммерческие реактивы «ДНК-Технология». Производитель гарантировал отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК цитокинов и референсных генов. Это позволило исключить дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНКазой.

Реакцию обратной транскрипции ставили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для обратной транскрипции применяли специфические олигонуклеотиды. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки. Нормировка проводилась по пяти референсным генам: *HPRT1*, *TBP*, *B2M*, *GUSB*, *ABL*. Использован метод сравнения индикаторных циклов (метод ΔCq). Уровень отмеченной экспрессии нормировали относительно референсных генов и медианных значений в контрольной группе (метод ΔCq). Медиану значений в контрольной группе принимали равной 1.

**Этическая экспертиза.** Запланированный дизайн исследования получил одобрение комиссии этического комитета ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени акад. В. И. Кулакова» Минздрава России.

При проведении исследования родителям девочек или их законному представителю в доступной форме была разъяснена суть и обоснована необходимость запланированных манипуляций. Изучение анамнеза и обследование осуществляли с письменного согласия и в присутствии законного представителя ребенка в соответствии с действующим законодательством. При отказе от проведения диагностических процедур обследование немедленно прекращалось, и девочка исключалась из исследования.

**Статистический анализ.** Для выбора статистических методов первоначально определяли тип исходных данных (возраст, рост, и т. п.). Для количественных переменных в качестве меры центральной тенденции выбрана медиана, а в качестве интервальной оценки — верхний и нижний квартили (25-й и 75-й процентиля). Для сравнения

количественных признаков использовались непараметрический U-тест Манна — Уитни для несвязанных совокупностей при сравнении двух независимых выборок. При анализе качественных или полуколичественных признаков оценивали частоту встречаемости в процентах и распределение по стратам. Для оценки значимости различий в распределении соответствующих признаков между группами использовали критерий χ<sup>2</sup>, а также точный критерий Фишера (F) для небольших выборок. Для оценки силы связи между предиктором и исходом вычисляли ОШ и ОР, которые приводились с 95%-ным ДИ. Значения считали статистически значимыми при p ≤ 0,05, высоко значимыми — при p < 0,001.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Медиана общей бактериальной массы образцов, полученных от здоровых девочек, составила 5,87 log/ГЭ/образец, в которой с учетом среднего процента обнаружения в каждом образце определялись следующие группы микроорганизмов: *Eubacterium spp.* — 82%, *Pr. bivia*/*Porphyromonas spp.* — 76%, *Megasphaera spp.*/*Veilonella spp.*/*Dialister* — 53%, *Peptostreptococcus spp.* — 41%, *Sneathia spp.*/*Fusobacterium spp.*/*Leptotrihia* — 29%, *Enterobacterium* — 27%, *Streptococcus spp.* — 24%, *Mobiluncus spp.*/*Corynebacterium spp.* — 18%, *Enterococcus spp.* — 16%, *Staphylococcus spp.* и *G. vaginalis* — 10%, *Bifidobacterium* и *A. vaginae* — 4%, *Lactobacillus spp.* — 2%.

Для уточнения количественных значений, характерных для здоровых девочек раннего возраста, с учетом данных об общей бактериальной массе за доминирующие условно приняты микроорганизмы, медианные значения которых были больше или равны 4 log/ГЭ/образец: *Pr. bivia*/*Porphyromonas* — 4,95; *Eubacterium spp.* — 4,91; *Megasphaera spp.*/*Veilonella spp.*/*Dialister* — 4,56; *Peptostreptococcus spp.* — 4,32. Оставшиеся микроорганизмы были отнесены к минорным представителям: *Streptococcus spp.* — 3,90 log/ГЭ/образец; *Mobiluncus spp.*/*Corynebacterium spp.* — 3,94 log/ГЭ/образец; *Enterobacterium* — 3,32 log/ГЭ/образец; *Sneathia spp.*/*Fusobacterium spp.*/*Leptotrihia* — 3,24 log/ГЭ/образец; *Lachnobacterium spp.*/*Clostridium spp.* — 2,94 log/ГЭ/образец; *Staphylococcus spp.* — 2,85 log/ГЭ/образец; *G. vaginalis* — 2,65 log/ГЭ/образец; *Enterococcus spp.* — 2,59 log/ГЭ/образец; *Bifidobacterium* — 2,44 log/ГЭ/образец; *Candida spp.* — 2,18 log/ГЭ/образец; *A. vaginae* — 1,85 log/ГЭ/образец; *Lactobacillus spp.* — 1,74 log/ГЭ/образец.

Современные данные микробиологических исследований указывают на зависимость видового представительства *Lactobacillus* от биохимических и физических свойств той среды, где они обитают, что может послужить ключом к патогенезу патологических процессов, развивающихся в области вульвы и влагалища. Поэтому нами был рассмотрен видовой состав *Lactobacillus spp.*, обнаруженных у здоровых девочек раннего возраста. Поскольку абсолютное количество *Lactobacillus spp.* находилось на пределе чувствительности метода, для исключения неспецифических результатов при анализе учитывали только те виды, количество которых превышало 5% от общего количества выявленных групп *Lactobacillus spp.* Среди лактобацилл, обитающих на слизистой влагалища у девочек раннего возраста, преобладал вид *L. iners*, составляя 59,7% от всех выделенных видов лактобацилл с абсолютными значениями 1,80 log /ГЭ/образец.

Таким образом, в микроценозе слизистой оболочки влагалища у девочек периода раннего детства доминируют анаэробные микроорганизмы порядка *Clostridiales*: семейств *Eubacte-*

riaceae (*Eubacterium* spp.), Bacteroidaceae (*Pr. bivia*/*Porphyromonas* spp.), Acidaminococcaceae (*Megasphaera* spp./*Veilonella* spp./*Dialister*), Peptostreptococcaceae (*Peptostreptococcus* spp.).

Микробиоценоз 68 девочек с острым бактериальным вульвовагинитом характеризовался типичной для данного возраста общей бактериальной массой, медиана которой составила 5,7 log/ГЭ/образец. Групповой состав микроорганизмов в пристеночном слое эпителия влажной стенки у пациенток с острым бактериальным вульвовагинитом не отличался от такового у здоровых девочек. А медианы количественного значения выявленных групп выглядели следующим образом: *Eubacterium* — 5,0 (3,5–5,7), *Peptostreptococcus* spp. — 4,7 (3,5–5,3), группы *Pr. bivia*/*Porphyromonas* spp. — 4,6 (3,9–5,3), *Megasphaera* spp./*Veilonella* spp./*Dialister* и *Enterobacterium* — 4,4 (3,1–5,0), *Streptococcus* spp. и *Sneathia* spp./*Fusobacterium* spp./*Leptotrichia* — 4,1 (3,7–4,8), *Bifidobacterium* — 3,9 (3,5–4,3) log/ГЭ/образец. ДНК *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp. и *Staphylococcus* spp., несмотря на наличие их у всех девочек, определялись в малом количестве — 3,5 (3,1–4,0) log/ГЭ/образец и 3,2 (3,2–3,4) log/ГЭ/образец соответственно. Еще меньшим оказалось содержание ДНК *Lactobacillus* spp. — 1,8 (1,3–2,1) log/ГЭ/образец. При этом ДНК *Lactobacillus* были обнаружены лишь в 6 из 130 образцов у девочек двух сравниваемых групп.

Важно отметить, что по количественному значению ДНК микроорганизмов, которые традиционно считаются основными возбудителями бактериального вульвовагинита, а именно *Enterobacterium*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., пациентки с этим заболеванием не отличались от здоровых сверстниц. При оценке насыщенности изученных образцов геномными эквивалентами всех обнаруженных микроорганизмов и грибов рода *Candida* оказалось, что они не могут быть признаны значимыми ассоциантами биотопы у девочек с острым бактериальным вульвовагинитом, так как концентрация их не превысила нижний порог чувствительности метода ( $\leq 3,0$  log/ГЭ/образец).

Неожиданной находкой стало в 2,6 раза более редкое выявление в структуре общей бактериальной массы девочек с острым вульвовагинитом микроорганизмов группы *Enterococcus* (27,3% против 72,3%;  $p = 0,014$ ) и в 3,2 раза более редкое — *G. vaginalis* (18,2% против 59,6%;  $p = 0,033$ ) по сравнению с участницами контрольной группы, количество ДНК *G. vaginalis* в этих образцах было небольшим — 2,8 (2,1–3,4) log/ГЭ/образец (рис. 1).

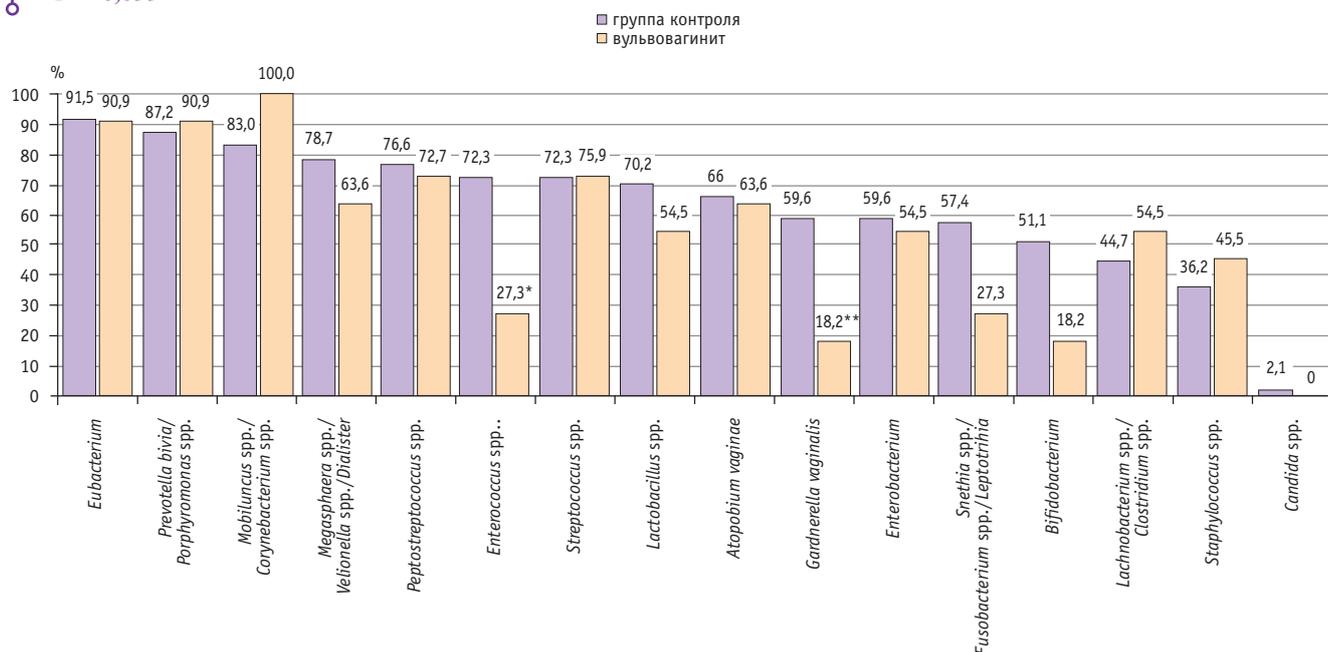
Корреляционный анализ взаимодействий выявленных групп микроорганизмов в структуре их общей биомассы в изученных образцах у пациенток с острым вульвовагинитом продемонстрировал сильную взаимозависимость количества *G. vaginalis* и *Lactobacillus* spp. Полученные данные позволили выдвинуть предположение о влиянии количественного равновесия этих микроорганизмов на состояние общего микробиоценоза и провести анализ величин соотношения *Lactobacillus* spp. и *G. vaginalis* (L/G) у девочек контрольной группы и с острым бактериальным вульвовагинитом. Для проверки данной гипотезы равновесным было принято количественное соотношение L/G у здоровых девочек, равное  $-0,5$  log/ГЭ/образец. Полученные графические данные показали значимо большее соотношение L/G у девочек с острым бактериальным вульвовагинитом ( $p < 0,05$ ). Для статистического подтверждения диагностической значимости величины этого соотношения был проведен ROC-анализ. Полученный коэффициент площади под кривой, который составил 0,8–0,9, свидетельствовал о высокой информативности величины L/G в диагностике острого бактериального вагинита у девочек в периоде раннего детства.

У 27 пациенток, имеющих в прошлом и на момент обследования клинические проявления атопического дерматита в области промежности и наружных половых органов, медиана общей бактериальной массы составила 5,9 log/ГЭ/образец, не отличаясь от таковой у девочек контрольной группы. Спектр микроорганизмов оказался аналогичным и был представлен 16 группами бактерий, не являющихся облигатно

Рис. 1. Частота обнаружения различных групп микроорганизмов у девочек с острым вульвовагинитом и в группе контроля, %.

\*  $P = 0,014$

\*\*  $P = 0,033$



патогенными. В преобладающем числе образцов, полученных у девочек с atopическим дерматитом, определены ДНК *Eubacterium* (92,6%), *Megasphaera spp./Velionella spp./Dialister* (92,6%), *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* (85,2%), *Pr. bivia/Porphyromonas spp.* (81,5%), *Peptostreptococcus spp.* (81,5%), *Enterococcus spp.* (81,5%) и *Streptococcus spp.* (77,8%). Наиболее редко выявляли ДНК *Lactobacillus spp.* (29,6%) и *G. vaginalis* (18,5%) (рис. 2).

Сравнительный анализ с группой здоровых сверстниц показал, что ДНК *G. vaginalis* при atopическом дерматите обнаруживалась в общей бактериальной массе в 3,2 раза ( $p = 0,001$ ), а *Lactobacillus spp.* — в 2,4 раза ( $p = 0,002$ ) реже.

При уточнении количества ДНК выделенных групп микроорганизмов в образце, расположенных в градиентном ряду, статистически значимых отличий от группы контроля не найдено: *Pr. bivia/Porphyromonas spp.* — 5,5 (5,1–6,1), *Eubacterium* — 5,1 (4,4–5,5), *Megasphaera spp./Velionella spp./Dialister* — 5,1 (4,4–5,4), *Snethia spp./Fusobacterium spp./Leptotrihia* — 4,9 (4,3–5,8), *Enterobacterium* — 4,7 (3,7–5,1), *Peptostreptococcus spp.* — 4,6 (4,2–5,4), *Streptococcus spp.* — 4,3 (3,9–4,5), *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* — 4,1 (3,6–4,3), *G. vaginalis* — 3,7 (3,2–4,4), *Staphylococcus spp.* — 3,6 (3,2–4,3), *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.* — 3,6 (3,3–3,8), *Bifidobacterium* — 3,4 (3,1–3,8), *A. vaginae* — 3,2 (2,3–4,0), *Enterococcus spp.* — 2,7 (2,2–3,2), *Lactobacillus spp.* — 2,3 (2,2–2,6) log/ГЭ/образец.

При анализе образцов, полученных от девочек, страдающих сращением малых половых губ, было выявлено, что медиана общей бактериальной массы характеризовалась значением 5,7 log/ГЭ/образец. Как и в других группах, в большинстве образцов обнаруживали анаэробные группы микроорганизмов. Однако по сравнению с участницами контрольной группы у пациенток с рецидивом сращения малых половых губ микроорганизмы группы *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* выявляли примерно в 1,2 раза чаще (100% против 83%;  $p = 0,018$ ) (рис. 3).

Количественные значения выявленных групп не имели статистически значимых различий с таковыми у здоровых девочек и были следующими: *Pr. bivia/Porphyromonas spp.* — 5,1 (4,5–5,6), *Eubacterium* — 4,8 (4,6–5,4), *Enterobacterium* — 4,5 (3,7–4,8), *Megasphaera spp./Velionella spp./Dialister* — 4,4 (4,0–5,1), *Peptostreptococcus spp.* — 4,4 (4,0–4,9), *Streptococcus spp.* — 4,3 (3,4–4,7), *Snethia spp./Fusobacterium spp./Leptotrihia* — 4,3 (3,3–5,0) log/ГЭ/образец. ДНК *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* определялись в массе, равной 3,8 (3,4–4,5), *Staphylococcus spp.* — 3,6 (3,2–4,0), *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.* — 3,4 (3,2–3,9), *Enterococcus spp.* — 3,0 (2,5–4,1), *G. vaginalis* — 3,0 (2,7–3,2), *Bifidobacterium* — 3,0 (2,8–3,3), *A. vaginae* — 2,2 (1,9–2,7), *Lactobacillus spp.* — 2,0 (1,7–2,2) log/ГЭ/образец. ДНК грибов рода *Candida* была обнаружена в пограничной с нормой концентрации, но лишь у одной из обследованных девочек.

Следует указать, что ни в одном из изученных 217 образцов не выявили ДНК *Str. pyogenes*, *St. aureus*, *M. genitalium*, *Ureaplasma spp.* (*Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*), *Ch. trachomatis*.

С учетом полученных данных представило интерес изучение состояния локального иммунитета слизистой оболочки влагалища. В доступной литературе не удалось обнаружить данных об особенностях локального иммунитета, исследованного с учетом спектра и уровней экспрессии генов цитокинов на слизистой оболочке влагалища у девочек периода раннего детства. Современные методики идентификации позволили нам получить уровни экспрессии определенных генов цитокинов и рассчитать их медиану и квартильные интервалы в обследованных группах. За нормативные приняли показатели девочек контрольной группы. Уровни экспрессии цитокинов были нормированы относительно референсных генов, что позволило принять полученные уровни экспрессии у здоровых девочек за единицу и провести сравнение их медианных значений и квартильных интервалов в клинических группах с использованием

Рис. 2. Частота обнаружения групп различных микроорганизмов у девочек с atopическим дерматитом и в группе контроля, %.

\*  $P = 0,001$

\*\*  $P = 0,002$

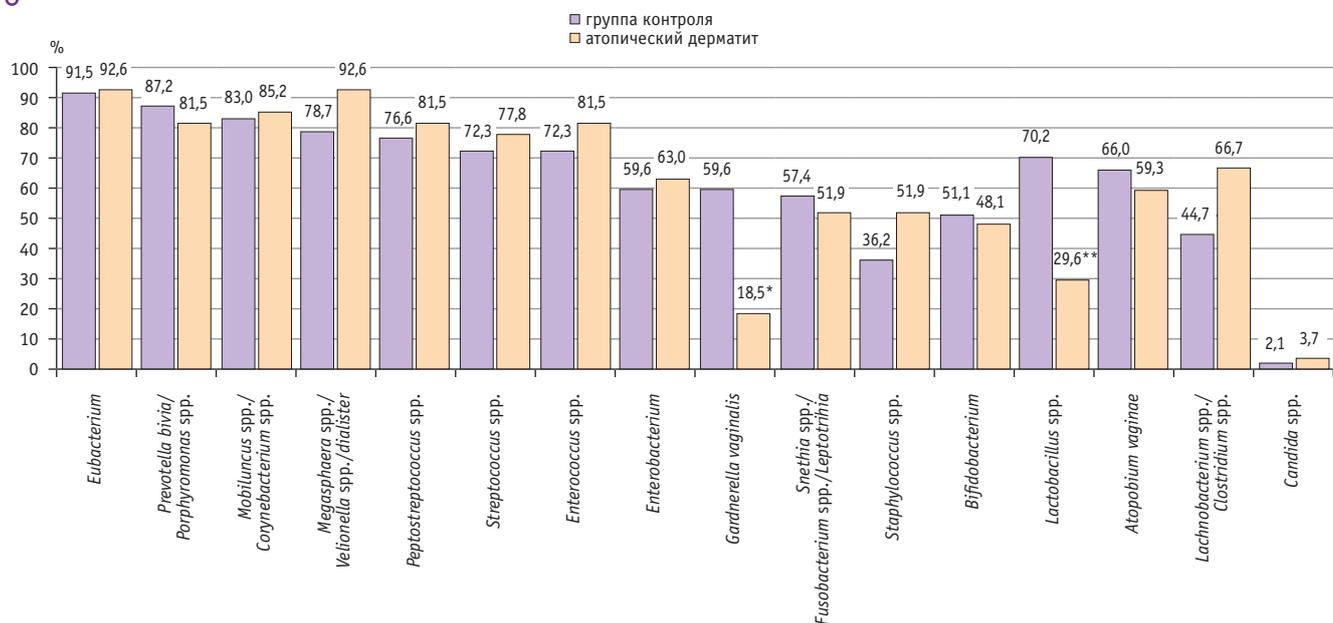
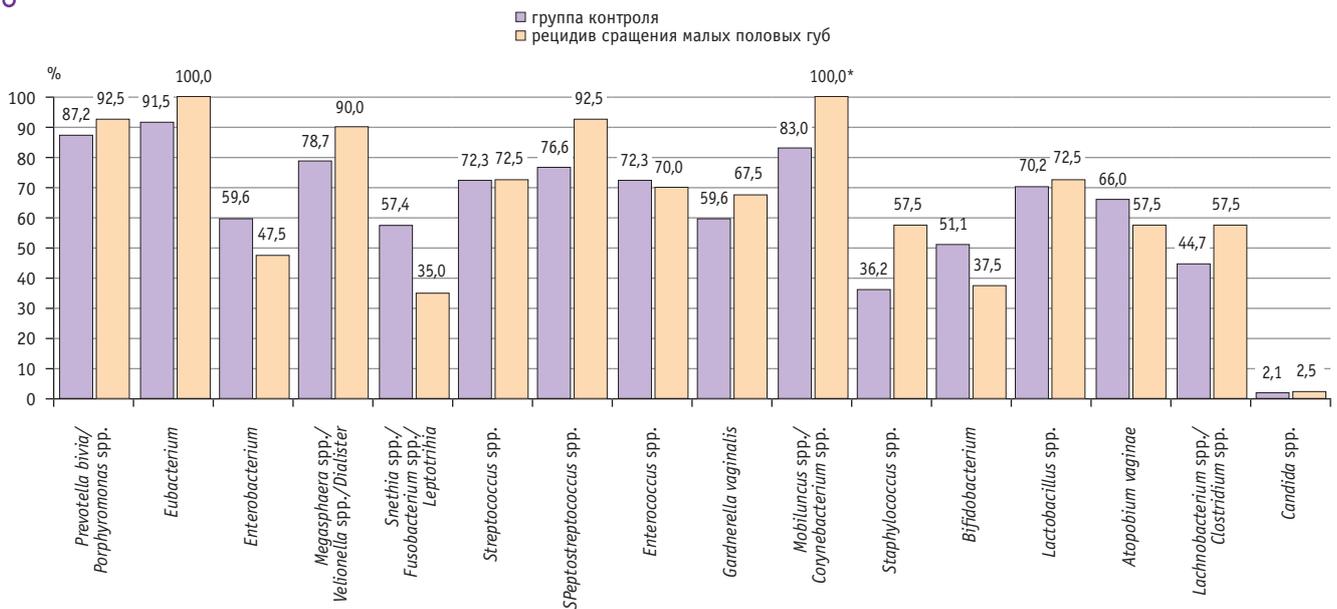


Рис. 3. Частота выявления групп различных микроорганизмов у девочек с рецидивом сращения малых половых губ и в группе контроля, %.  
\*  $P = 0,018$



статистических методов оценки. Более подробно описаны лишь те, которые оказались значимо изменены.

По сравнению с нормой при остром бактериальном вульвовагините уровень экспрессии маркера лейкоцитарной реакции CD45 оказался увеличенным в 1,7 раза ( $p = 0,01$ ). Как известно, этот цитокин, являясь общим лейкоцитарным антигеном, экспрессируется популяцией Т-, В- и Nk-клеток, моноцитами/макрофагами. Напротив, уровень экспрессии ИЛ-18, продуцируемого макрофагами и способствующего индукции выработки ИФН- $\gamma$ , оказался в 1,9 раза меньшим, чем у здоровых участниц исследования ( $p = 0,04$ ). Других значимых отклонений от группы контроля с учетом критерия Манна — Уитни не было.

В группе девочек с атопическим дерматитом выявлено более низкое, чем в контрольной группе, содержание большинства мРНК генов цитокинов. Однако значимо меньшими были лишь уровни ИЛ-8 ( $p = 0,03$ ), ИЛ-10 ( $p = 0,02$ ) и CD45 ( $p = 0,05$ ). Подобная ситуация вполне объяснима, так как ИЛ-8, вырабатываемый тучными клетками, эндотелием, моноцитами, лимфоцитами, воздействуя на нейтрофилы, базофилы, Т-клетки, кератиноциты, вызывает хемотаксис, ангиогенез, освобождение супероксида. ИЛ-10, продуцируемый Т-клетками, подавляет синтез цитокинов, воспалительный и иммунный ответ, в том числе Т-клеточную пролиферацию.

У девочек с рецидивом сращения малых половых губ отмечались низкие уровни экспрессии абсолютно всех изученных цитокинов. В 1,4 раза меньше нормы была экспрессия ИЛ-18 ( $p = 0,04$ ), в 1,2 раза — ИЛ-10 ( $p = 0,008$ ), в 2,7 раза — ИЛ-1 $\beta$  ( $p = 0,003$ ). ИЛ-1 $\beta$  секретируется макрофагами, большими гранулярными лимфоцитами и В-клетками. Он индуцирует экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия, что способствует миграции лейкоцитов. Участвуя в локальном и системном воспалении и являясь частью врожденного иммунитета, ИЛ-1 $\beta$  представляет собой один из мощнейших регуляторов активности лейкоцитов.

Показатель ИЛ-12 $\alpha$  при сращении малых половых губ был меньше в 1,9 раза, чем у здоровых девочек ( $p = 0,003$ ).

Этот цитокин продуцируется макрофагами, дендритными клетками. Представляя собой сильный стимулятор продукции ИФН- $\gamma$  Т- и Nk-клеток, ИЛ-12 $\alpha$  регулирует Th-1 дифференцировку.

У девочек с рецидивом сращения малых половых губ по сравнению с контрольной группой была в 1,9 раза меньше экспрессия ТФР- $\beta$  ( $p = 0,0001$ ). Продуктами этого белка служат множество клеток, включая стромальные, эпителиальные клетки, макрофаги, регуляторные Т-лимфоциты, многие разновидности опухолевых клеток. Он секретируется в неактивной форме, и для его активации требуется протеолитическое расщепление молекулы, чтобы она приобрела способность взаимодействовать с высокоаффинными рецепторами. Одной из функций ТФР- $\beta$  является снижение выработки воспалительных цитокинов, способствующее заживлению ран, подавлению роста рубцовой ткани.

Кроме того, у пациенток с рецидивом сращения малых половых губ была в 1,5 раза меньше, чем в группе контроля, экспрессия ФНО- $\alpha$  ( $p = 0,01$ ), выработка которого осуществляется макрофагами, тучными клетками и лимфоцитами. Этот цитокин действует как активатор макрофагов, гранулоцитов, цитотоксических клеток, активирует адгезию лейкоцитов к клеткам эндотелия, индуцирует белок острой фазы, стимулирует ангиогенез, повышает выработку молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го класса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные, можно заключить, что наличие рецидивирующего сращения малых половых губ у девочек раннего возраста не связано с острым воспалительным процессом инфекционной этиологии. Групповое представительство микроорганизмов на слизистой оболочке влагалища у девочек раннего возраста характеризуется динамичным изменением качественного состава различных их групп. Возможно, баланс микробиологического сообщества влагалища у таких девочек сохраняется за счет присутствия определенных групп микроорганизмов при их минимальных количественных значениях. При этом немаловажную

регулирующую роль играют *Gardnerella vaginalis* с определенными минимальными количественными показателями.

Использование ПЦР в режиме реального времени позволяет оценить состояние микроценоза слизистой влагалища у девочек дошкольного возраста, оно обязательно должно включать расширенный спектр микроорганизмов, в том числе типирование *Lactobacillus spp.*, отдельное определение *G. vaginalis*, *Enterococcus* и учет как общей группы *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.*, так и их патогенных видов. Оценивать количественные значения полученных групп микроорганизмов следует, обращая особое внимание на наличие и количество *Lactobacillus spp.* и *G. vaginalis*. При повышении их

соотношения более  $-0,5 \log/\text{ГЭ}/\text{образец}$  и появлении клинической симптоматики устанавливают диагноз вагинита.

У девочек дошкольного возраста с целью прогнозирования различных патологических процессов целесообразно проводить анализ локальной экспрессии мРНК генов цитокинов ИЛ-18, CD45, ТФР- $\beta$ , ФНО- $\alpha$ . При снижении уровней экспрессии мРНК генов ТФР- $\beta$  и ФНО- $\alpha$  у девочек в возрасте до 3 лет учитывают возможный риск рецидива сращения малых половых губ. В свою очередь, при росте уровней экспрессии мРНК генов CD45 и снижении такового ИЛ-18 по сравнению с референсными значениями устанавливают диагноз вульвовагинита.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kumetz L. M., Quint E. H., Fisseha S., Smith Y. R. Estrogen treatment success in recurrent and persistent Labial agglutination. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 2006; 19(6): 381–4.
2. Fields S. W. Case report: treatment of labial adhesions in a child. *J. RX Trial.* 2006. 10(1): 66–7.
3. Dei M., Di Maggio F., Di Paolo G., Bruni V. Vulvovaginitis in childhood. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2010; 24(2): 129–37.
4. Orga P. L., Welliver R. C. Sr. Effects of early environment on mucosal immunologic homeostasis, subsequent immune responses and disease outcome. In: Barker D. J. P., Bergmann R. L., Orga P. L., eds. *The window of opportunity: pre-pregnancy to 24 months of age.* 61. Basel: Karger; 2008: 145–81.
5. Yang T. M., William W. K. To Paediatric labial adhesions: evaluation of response to topical oestrogen therapy. *Hong Kong J. Gynaecol. Obstet. Midwif.* 2007; 7(1): 37–40.
6. Батырова З. К., Уварова Е. В., Донников А. Е., Трофимов Д. Ю. Способ центильной оценки микроценоза слизистой влагалища у девочек в возрасте от 0 до 3 лет. Патент на изобретение № 2545897 от 26.02.2015. [Batyrova Z. K., Uvarova E. V., Donnikov A. E., Trofimov D. Yu. *Sposob tsentil'noi otsenki mikrotsenoza slizистой vlagalishcha u devochek v vozraste ot 0 do 3 let.* Patent na izobretenie № 2545897 ot 26.02.2015. (in Russian)]
7. Батырова З. К., Уварова Е. В., Латыпова Н. Х., Донников А. Е., Муравьева В. В., Тимофеева Л. А. и др. Клинические и микробиологические особенности вульвовагинита у девочек дошкольного возраста, возможности диагностики на ранних этапах развития. *Фарматека.* 2015; 12(305). <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/31720> [Batyrova Z. K., Uvarova E. V., Latypova N. Kh., Donnikov A. E., Murav'eva V. V., Timofeeva L. A. i dr. *Klinicheskie i mikrobiologicheskie osobennosti vul'vovaginita u devochek doshkol'nogo vozrasta, vozmozhnosti diagnostiki na rannikh etapakh razvitiya.* *Farmateka.* 2015; 12(305). <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/31720> (in Russian)]
8. Волкова Е. Н. Атопический дерматит. *Лечащий врач.* 2006; 9: 22–9. [Volkova E. N. *Atopicheskii dermatit.* *Lechashchii vrach.* 2006; 9: 22–9. (in Russian)]
9. Гриневич Е. В. Характеристика микробиоценозов влагалища, кишечника и мочевого пузыря при вульвовагинитах у девочек раннего возраста в зависимости от различных факторов риска: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Смоленск; 2005. 20 с. [Grinevich E. V. *Kharakteristika mikrobiotsenozov vlagalishcha, kishechnika i mochevyvodyashchikh putei pri vul'vovaginitakh u devochek rannego vozrasta v zavisimosti ot razlichnykh faktorov riska:* Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Smolensk; 2005. 20 s. (in Russian)]
10. Миннигулова Г. М. Медико-социальные аспекты возникновения синехий вульвы у девочек «нейтрального периода»: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Самара; 2009. 23 с. [Minnigulova G. M. *Mediko-sotsial'nye aspekty vozniknoveniya sinekhiy vul'vy u devochek "neitral'nogo perioda":* Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Samara; 2009. 23 s. (in Russian)]
11. Намазова, Л. С., Вознесенская Н. И., Сурков А. Г. Атопический дерматит. *Лечащий врач.* 2006; 4: 72–8. [Namazova, L. S., Voznesenskaya N. I., Surkov A. G. *Atopicheskii dermatit.* *Lechashchii vrach.* 2006; 4: 72–8. (in Russian)]

Библиографическая ссылка:

Уварова Е. В., Батырова З. К., Кумыкова З. Х., Донников А. Е., Бурменская О. В., Намазова-Баранова Л. С. Микробиоценоз и локальный иммунитет слизистой оболочки влагалища у девочек в раннем детстве: норма и патология // *Доктор.Ру.* 2017. № 3 (132). С. 59–65.

Citation format for this article:

Uvarova Ye. V., Batyrova Z. K., Kumyukova Z. Kh., Donnikov A. Ye., Burmenskaya O. V., Namazova-Baranova L. S. Microbiota and Local Immunity of Vaginal Mucosa in Very Young Girls: Normal and Abnormal Parameters. *Doctor.Ru.* 2017; 3(132): 59–65.