

В СОВРЕМЕННОМ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТОЧНОМ ИССЛЕДОВАНИИ ПОДТВЕРЖДЕНА РОЛЬ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ВЛАГАЛИЩА

Полученные результаты позволяют сформулировать рекомендации по оптимальному составу пробиотиков для коррекции бактериального вагиноза

*Бактериальный вагиноз развивается вследствие дисбаланса влагалищной микробиоты и опасен тем, что увеличивает риск развития гинекологических и акушерских осложнений, инфекций мочевыводящих путей. Эффективным и безопасным способом коррекции бактериального вагиноза является назначение в составе комплексной терапии пероральных пробиотиков. Однако важно знать, какие бактерии должны быть включены в состав подобных препаратов. Результаты современного генетически точного исследования из США и ряда более ранних исследований свидетельствуют о потенциально высокой роли 4 лактобактерий в борьбе с бактериальным вагинозом: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus rhamnosus*.*

Как и во всех других полостях организма, сообщающихся с внешней средой, во влагалище содержится нормальная микробиота. У здоровых женщин она представлена лактобактериями, транзиторными и комменсальными анаэробными и аэробными бактериями, грибами рода *Candida*. Эти микроорганизмы подкисляют среду влагалища до pH < 4,5, продуцируют перекись водорода, выделяют антибиотики, вступают в конкурентный антагонизм с чужеродными бактериями за места связывания с эпителием. Как следствие, происходит защита влагалища от развития инфекций [1].

Исследователи пока не знают точных причин, но в определенный момент жизни женщины может произойти дисбаланс в составе влагалищной микробиоты. Наблюдается уменьшение содержания лактобактерий, влекущее за собой увеличение pH > 4,5. В свою очередь, снижение кислотности приводит к размножению анаэробных бактерий. Как следствие, развивается инфекционное невоспалительное заболевание, называемое бактериальным вагинозом. Оно опасно тем, что увеличивает риск развития гинекологических (эндометрит, сальпингит, тубоовариальный абсцесс) и акушерских (аборт, преждевременный разрыв плодных оболочек, преждевременные роды, послеродовой эндометрит) осложнений, инфекций мочевыводящих путей [1].

Одним из наиболее эффективных способов борьбы с бактериальным вагинозом является восстановление баланса влагалищной микробиоты за счет вводимых извне пробиотиков. Данный подход физиологичен, безопасен, однако требует правильного подбора бактерий, включаемых в состав лечебных средств. Чтобы помочь врачам и пациентам, группа ученых из США под руководством доктора J. Ravel выполнила генетически точное исследование, направленное на идентификацию наиболее значимых представителей нормальной влагалищной микробиоты. Полученные результаты

были опубликованы в журнале *Proceedings of the National Academy of Sciences* под названием *Vaginal microbiome of reproductive-age women* («Вагинальная микробиота женщин репродуктивного возраста»). Ниже мы приводим обзор данной работы. Кроме того, будут освещены данные некоторых более ранних работ и приведены рекомендации по оптимальному составу пробиотиков для лечения бактериального вагиноза, отвечающие современным научным знаниям.

Результаты исследования J. Ravel и соавт. «Вагинальная микробиота женщин репродуктивного возраста» [2]

Характеристика исследования

В исследование было включено 396 здоровых женщин, ведущих половую жизнь и относящихся к четырем этническим группам: белые (n = 98), азиатки (n = 97), африканки (n = 104) и латиноамериканки (n = 97). Качественное и количественное содержание бактерий в нормальной влагалищной микробиоте было определено генетически (секвенирование коротких, гипервариабельных областей 16S рРНК генов). Были изучены взаимосвязи между доминирующими бактериями и тремя основными параметрами: этнической принадлежностью женщин, pH влагалища и величиной баллов по шкале Нугента (шкала для диагностики бактериального вагиноза). При этом pH влагалища определяли по изменению цвета специальной влагалищной перчатки. Для подсчета баллов по шкале Нугента выполняли микроскопическое исследование мазка из влагалища. Чем меньше в поле зрения лактобацилл и больше анаэробов, тем больше получаемое значение. Величину баллов в диапазоне 0–3 расценивали как нормальную влагалищную флору, 4–6 — как промежуточное состояние, 7–10 — как указывающую на бактериальный вагиноз.

Выделено 5 основных типов влагалищных бактериальных сообществ

Генетический анализ материала, полученного от женщин, позволил с большой точностью выявить сотни видов бактерий, находящихся во влагалище. Это намного больше, чем при проведении стандартных тестов, поскольку многие виды бактерий не поддаются культивированию.

Далее авторы выполнили кластерный анализ, который позволил объединить в группы женщин со сходными влагалищными бактериальными сообществами. В общей сложности было выделено пять таких групп. Среди множества бактерий в группах I, II, III и V доминирующими видами были *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus jensenii* соответственно (рис. 1). Группа IV была гетерогенной и характеризовалась высоким содержанием строго анаэробных бактерий, включая *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Fingoldia*, *Mobiluncus*.

Таким образом, у большинства женщин во влагалищной флоре доминировали лактобактерии (группы I, II, III и V = 73 % от общего количества женщин, включенных в исследование). В группе IV лактобактерии не были доминирующим видом. Однако, несмотря на это, распространенность лактобактерий была довольно высока: *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus crispatus* встречались у 78,7 и 51,9 % женщин данной группы соответственно.

У белых женщин и азиаток во влагалище доминируют лактобактерии

Как было отмечено выше, в исследование были включены женщины четырех разных этнических групп. Статистический анализ показал, что они достоверно различаются по выделенным группам влагалищных бактериальных сообществ ($p < 0,0001$). Группы I, II, III и V были обнаружены у 89,7 % белых женщин и 80,2 % азиаток по сравнению с 61,9 % африканок и 59,6 % латиноамериканок. Следовательно, у белых женщин и азиаток больше вероятность того, что доминирующим видом во влагалище будут лактобактерии. Группа IV была выявлена у 38,9 % африканок и 34,3 % латиноамериканок по сравнению с 9,3 % белых женщин и 17,6 % азиаток. Видно, что у африканок и латиноамериканок больше вероятность того, что во влагалище будет наблюдаться высокое содержание анаэробных бактерий.

Важно отметить, что в любом случае во влагалище женщин будут присутствовать бактерии, синтезирующие молочную кислоту. Для групп I, II, III и V это прежде всего *Lactobacillus*, для группы IV — *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Streptococcus*, *Atopobium*.

Лактобактерии связаны с более низкими значениями pH влагалища и более низкими баллами по шкале Нугента

Взаимосвязи между влагалищными бактериальными сообществами были визуализированы с помощью метода «анализ главных компонент» и представлены в 3D-пространстве. На рис. 2 видим схематическое изображение оригинальных рисунков.

После того, как на тетраэдрах были размещены все бактериальные сообщества, их по-разному раскрасили в зависимости от pH влагалища или баллов по шкале Нугента.

На рис. 2А видно, что самые высокие значения pH наблюдались в сообществах, где доминировали анаэробы (IV группа). Аналогично, из рис. 2Б следует, что самые высокие баллы по шкале Нугента наблюдались в сообществах, где доминировали анаэробы (IV группа). Оба рисунка свидетельствуют о сильной корреляции высоких значений pH и высоких баллов по шкале Нугента (IV группа).

Самые низкие значения pH были обнаружены в I группе, где доминировали *Lactobacillus crispatus*, — $4,0 \pm 0,3$. Самые высокие значения pH были выявлены в IV группе, где в большом количестве были представлены анаэробы, — $5,3 \pm 0,6$ (рис. 3). Интересно, что в сообществах, где доминировали другие виды лактобактерий, были отмечены несколько более высокие значения pH по сравнению с I группой (II группа — $5,0 \pm 0,7$; III группа — $4,4 \pm 0,6$; V группа — $4,7 \pm 0,4$). Это говорит о том, что бактериальные сообщества групп II, III и V либо продуцируют меньше молочной кислоты, либо имеют более мощные буферные системы по сравнению с I группой.

При анализе этнических групп более низкие значения pH были обнаружены у белых женщин и азиаток ($4,20 \pm 0,30$ и $4,40 \pm 0,59$ соответственно) по сравнению с африканками и латиноамериканками ($4,70 \pm 1,04$ и $5,00 \pm 0,59$ соответственно) (рис. 4). Это связано с тем, что у африканок и латиноамериканок более часто встречались бактериальные сообщества IV группы, связанные с более высокими значениями pH (рис. 3).

С осторожностью должны быть интерпретированы данные, касающиеся шкалы Нугента. Баллы по ней подсчитываются на основе микроскопической оценки мазков из влагалища. Чем меньше в поле зрения лактобацилл и больше анаэробов, тем больше получаемое значение. В стандартных клинических условиях значение по шкале Нугента 7–10 баллов считается признаком бактериального вагиноза. Однако в рассматриваемое исследование J. Ravel и соавт. были включены только здоровые женщины. При этом оказалось, что высокое содержание анаэробных бактерий может быть вариантом нормальной влагалищной микробиоты у африканок и латиноамериканок. Детально это было рассмотрено выше. Вполне естественно, что получающиеся у них высокие значения по шкале Нугента никак не могут быть признаны патологическими.

Скорее, должны быть пересмотрены критерии диагностики бактериальных вагинозов с учетом того, что у африканок и латиноамериканок IV группа бактериальных сообществ (много анаэробов) является одним из вариантов нормы и характеризуется высокими значениями pH и высокой величиной баллов по шкале Нугента.

Данные предыдущих исследований

До разработки методов генетической идентификации бактерий, обитающих во влагалище, использовали культуральные методы — культивирование бактерий на питательной среде. В ходе подобных исследований были получены следующие результаты:

- во влагалище женщин США, ведущих половую жизнь, наиболее часто обнаруживали *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* [3];
- во влагалище женщин Австрии к концу первого триместра беременности наиболее часто выявляли

Lactobacillus crispatus, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus rhamnosus* [4];

— во влагалище женщин Японии, ставших матерями, доминировали *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus gasseri* [5].

Суммирование этих данных позволяет признать, что наиболее распространенными видами лактобактерий у женщин являются *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus rhamnosus*. Это в целом совпадает с результатами, полученными в работе J. Ravel и соавт. (рис. 1). Отличие заключается в том, что был отмечен еще один вид лактобактерий — *Lactobacillus rhamnosus*. По-видимому, роль этих лактобактерий не стоит недооценивать, учитывая их высокую клиническую эффективность у женщин с бактериальными вагинозами (табл. 1).

Таблица 1. Роль *L.rhamnosus* в лечении бактериальных вагинозов по данным клинических исследований

Исследование	Пробиотики	Результаты
К. Anukam и соавт., 2006 [6]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>	Усиление эффективности терапии метронидазолом
R.C. Martinez и соавт., 2009 [7]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>	Усиление эффективности терапии тинидазолом
L. Petricevic и соавт., 2008 [8]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Усиление эффективности терапии клиндамицином
P.G. Larsson и соавт., 2008 [9]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>	При совместном назначении с клиндамицином увеличивают время до возникновения рецидивов

Оптимальный состав пробиотиков и доступность на фармацевтическом рынке

Исходя из данных исследования J. Ravel и соавт. и более ранних исследований, оптимальный пробиотик для коррекции бактериального вагиноза должен содержать следующие виды лактобактерий: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus rhamnosus*. Наличие всех этих бактерий в одном препарате, с одной стороны, усиливает лечебное воздействие. С другой стороны, происходит перестраховывание — мы не знаем, какой вид лактобактерий доминирует у данной конкретной женщины, а использование всех четырех видов позволяет неизбежно попасть в цель и надежно достичь клинических успехов.

Вид *Lactobacillus iners*, по-видимому, не должен включаться в состав пробиотиков. Эта бактерия не продуцирует перекись водорода, что ставит под сомнение ее лечебную эффективность. Определенным подтверждением тому служит обнаружение *Lactobacillus iners* у большинства больных с бактериальным вагинозом [1, 10].

На фармацевтическом рынке Украины присутствует препарат под названием Флориум®, производимый в Италии и представляемый в нашей стране фармацевтической компанией Ananta Medicare (Великобритания). В состав препарата входят четыре вида лактобактерий, оптимально подходящих для коррекции влагалищной микрофлоры: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus rhamnosus*. Все перечис-

ленные виды бактерий продуцируют молочную кислоту и перекись водорода, выделяют антибиотики и вступают в конкурентный антагонизм с чужеродными бактериями. Устойчивость к кислой среде желудка и желчным кислотам обеспечивает успешный гастроинтестинальный транзит этих бактерий при пероральном приеме, с последующей миграцией во влагалище.

Флориум® назначают вместе с антибиотиками/синтетическими химиотерапевтическими средствами для комплексного лечения бактериального вагиноза. Дополнительным эффектом пробиотика является нормализация кишечной микрофлоры и повышение иммунитета. Курс лечения препаратом длится 7 дней, его принимают перорально по 1 капсуле (325 мг) 2 раза в день (утром и вечером) за 30 мин до еды. При необходимости курс лечения может быть повторен через 3 месяца.

Список литературы

1. Scientific background of Astarte. — 2016. — Материал предоставлен фармацевтической компанией Ananta Medicare.
2. Vaginal microbiome of reproductive-age women / Ravel J., Gajer P., Abdo Z. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2011. — V. 108(Suppl. 1). — P. 4680-4687.
3. Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species // J. Infect. Dis. — 1999. — V. 180, № 6. — P. 1950-1956.
4. Vaginal *Lactobacillus* microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy / Kiss H., Kögler B., Petricevic L. et al. // BJOG. — 2007. — V. 114, № 11. — P. 1402-1407.
5. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants / Song Y.L., Kato N., Matsumiya Y. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — V. 37, № 9. — P. 3062-3064.
6. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial / Anukam K., Osazuwa E., Ahonkhai I. et al. // Microbes. Infect. — 2006. — V. 8, № 6. — P. 1450-1454.
7. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / Martinez R.C., Franceschini S.A., Patta M.C. et al. // Can. J. Microbiol. — 2009. — V. 55, № 2. — P. 133-138.
8. Petricevic L., Witt A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis // BJOG. — 2008. — V. 115, № 11. — P. 1369-1374.
9. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study / Larsson P.G., Stray-Pedersen B., Rytting K.R., Larsen S. // BMC Womens Health. — 2008. — V. 8, № 3.
10. Ma B., Forney L.J., Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease // Annu. Rev. Microbiol. — 2012. — V. 66. — P. 371-389.

Подготовил к.м.н. А.В. Савустьяненко ■

Кластерный анализ позволил выявить 5 основных типов влагалищных бактериальных сообществ

Доминирующие бактерии:

Prevotella,
Dialister,
Atopobium,
Gardnerella,
Megasphaera,
Peptoniphilus,
Sneathia,
Eggerthella,
Aerococcus,
Fingoldia,
Mobiluncus

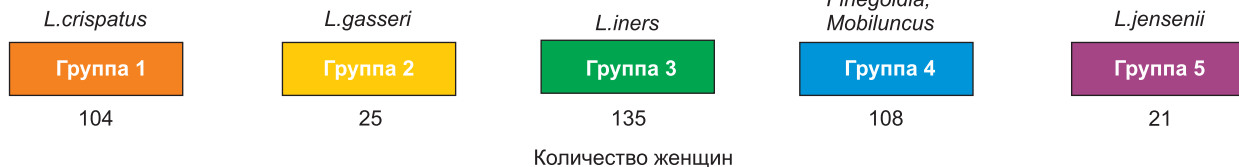


Рисунок 1. Генетическая идентификация влагалищных бактерий (16S рРНК гены) позволила выявить сотни видов, в большинстве своем не культивируемых в обычных условиях. Всю совокупность бактерий, живущих во влагалище конкретной женщины, называют влагалищным бактериальным сообществом. Применение современного статистического метода – кластерного анализа – позволило классифицировать всех женщин, включенных в исследование, по 5 основным группам влагалищных бактериальных сообществ. При этом в каждой группе были определены доминирующие виды бактерий

Визуализация с помощью «анализа главных компонент» дала возможность наглядно представить, что самые высокие значения pH и баллы по шкале Нугента связаны с анаэробными бактериями

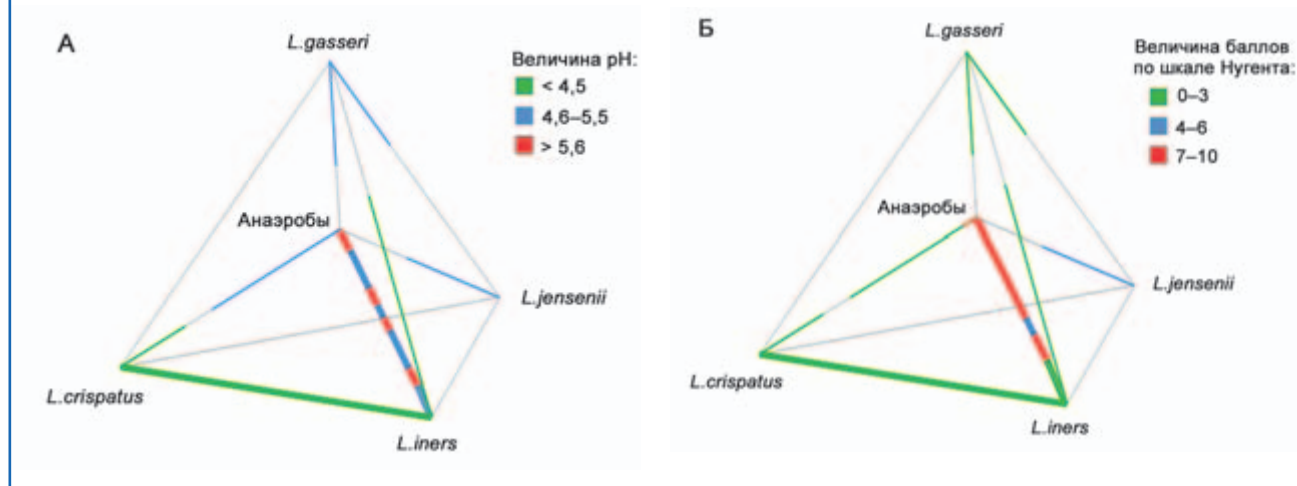


Рисунок 2. Взаимосвязи между влагалищными бактериальными сообществами были визуализированы с помощью метода «анализ главных компонент» и представлены в 3D-пространстве (схематическое изображение оригинальных рисунков). Сообщества групп I, II, III и V, в которых доминировали лактобактерии, показаны в 4 внешних вершинах тетраэдра, сообщества группы IV с большим количеством анаэробов – во внутренней вершине. Если сообщество размещалось на ребре тетраэдра (между двумя вершинами), это означало, что в нем доминировало два вида бактерий. Например, точка в середине ребра между *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus iners* означает, что в данном сообществе поровну доминируют два данных вида бактерий. После того, как на тетраэдрах были размещены все бактериальные сообщества, их по-разному раскрасили в зависимости от pH влагалища или баллов по шкале Нугента

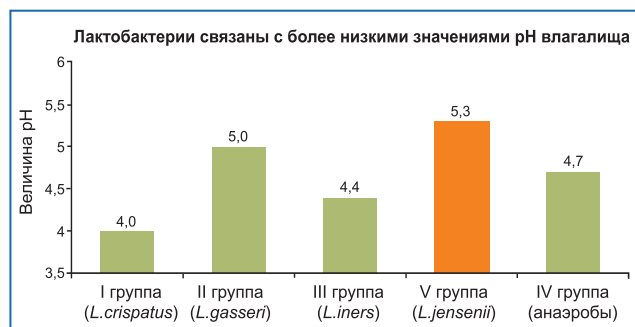


Рисунок 3. Взаимосвязь между выделенными группами влагалищных бактериальных сообществ и pH влагалища

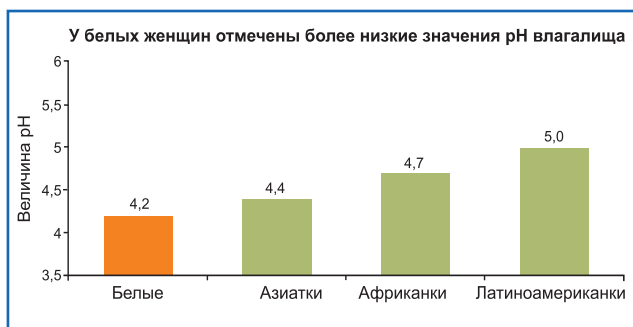


Рисунок 4. Взаимосвязь между этнической принадлежностью женщин и pH влагалища