

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
Мордовского государственного университета
профессор



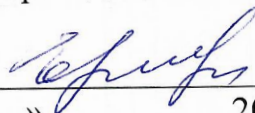
В. Д. Черкасов

_____ 2008 г.

О Т Ч Е Т №2

для ООО «Бифилюкс»

Руководитель работы:
доктор медицинских наук профессор

 Е. Ю. Еремина
«____» _____ 2008 г.

г. Саранск

О Т Ч Е Т №2
о результатах исследования эффективности
синбиотических биокомплексов «Нормофлорины Л и Б»
при бактериальном вагинозе

Введение

В настоящее время бактериальный вагиноз (БВ) занимает лидирующее место (до 60-80%) в структуре воспалительных заболеваний женских половых органов (Leitch H. et al., 2003; Morelli L. et al., 2004) и диагностируется у 30 – 57,6% женщин репродуктивного возраста (Burton J.P. et al., 2003; Nishijima K. et al., 2004). По данным Кира Е.Ф. (2001), БВ встречается у 19,2% женщин репродуктивного возраста в общей популяции и у 86,6% женщин с патологическими белями. Bleker O.P. et al. (1989) выявили БВ у 38% женщин, Von U.B.Houme (1989) диагностировал БВ у 62% женщин. По данным Научного центра АГиП РАМН, БВ выявляется у 24% практически здоровых небеременных женщин и у 61% пациенток с жалобами на обильные выделения из половых путей. Среди беременных женщин БВ встречается в 10-46% случаев. Таким образом, данные литературы свидетельствуют о значительном распространении БВ, преимущественно у женщин репродуктивного возраста. Считается, что практически каждая женщина в своей жизни отмечает хотя бы один случай БВ.

БВ – это инфекционный невоспалительный синдром, характеризующийся резким снижением кислотности влагалища и концентрации лактобацилл вследствие нарушения экосистемы влагалища, которое опосредовано усиленным ростом ассоциации анаэробных (*Prevotella*, *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Mobiluncus* spp.) и облигатно-анаэробных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides*, *Mycoplasma hominis*). Таким образом, БВ рассматривается как состояние вагинального дисбиоза, при котором происходит замещение нормальной микрофлоры на условно-патогенную и патогенную.

Современное название заболевания – БВ принято в 1984 г. на I Международном симпозиуме по вагинитам в Швеции. Повышение количества бактерий во влагалище объясняет название «бактериальный», а отсутствие лейкоцитов – клеток, ответственных за воспаление, объясняет название «вагиноз». У здоровых женщин репродуктивного возраста вагинальное отделяемое содержит 10^5 - 10^7 микроорганизмов в 1 мл и состоит из разнообразных видов, число которых может достигать 40 и более. Ведущее место в вагинальном биотопе занимают H_2O_2 -продуцирующие факультативные *Lactobacillus* spp. (45-98%) – в основном микроаэрофилы. Значительно меньшую часть составляют облигатно-анаэробные виды лактобацилл. На долю других видов микроорганизмов (бактероиды, стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, гарднерелла, облигатные анаэробы), находящихся в малых концентрациях, приходится менее 5-10% общей вагинальной флоры. Ряд авторов отмечают, что *Gardnerella vaginalis* выделяется из влагалища у 5-60% здоровых женщин,

Mobiluncus spp. — у 5% здоровых женщин, а соотношение анаэробов и аэробов составляет по крайней мере 10:1.

На фоне преобладания кислотопродуцирующих микроорганизмов создается оптимально кислая среда цервико-вагинальной зоны, что и обуславливает равновесие между различными формами бактерий, колонизирующих женские половые пути. Нормальная микрофлора влагалища обеспечивает колонизационную резистентность, которая подразумевает совокупность механизмов, обеспечивающих постоянство количественного и видового состава нормальной микрофлоры, что предотвращает заселение влагалища патогенными микроорганизмами или чрезмерное размножение условно патогенных микроорганизмов, входящих в состав нормального микроценоза. Концентрация таких кислотопродуцирующих микроорганизмов, как лактобактерии и бифидобактерии, которые и формируют во влагалище женщины естественный барьер бактериальной защиты, называемый колонизационной резистентностью, имеет определяющую роль для нормального функционирования цервико-вагинальной ниши.

Результаты современных исследований позволяют характеризовать вагинальную экосистему как весьма динамичную и многокомпонентную по видовому составу. Строгая эстроген-зависимость является ее отличительной особенностью и объясняет изменчивость в разные периоды жизни женщины.

Исследования Hill G.B. (1993) показали, что удельный вес лактобактерий при БВ снижается до 30% от общего числа микроорганизмов. В отличие от пациенток с нормальной флорой, больные с БВ имеют не факультативные, а анаэробные лактобациллы. В ряде случаев на фоне абсолютного преобладания микроорганизмов, ассоциированных с БВ, могут присутствовать лактобактерии в низком титре и, как правило, это анаэробные лактобактерии, не способные продуцировать H_2O_2 . При этом уровень анаэробных микроорганизмов может увеличиваться в 1000 раз. Здоровые женщины колонизированы H_2O_2 -продуцирующими лактобациллами, тогда как лактобациллы у больных с БВ обладают недостаточной способностью продуцировать H_2O_2 , которая подавляет рост патогенных микроорганизмов ввиду прямой токсичности. Концентрация различных факультативных (*Gardnerella vaginalis*) и анаэробных (*Bacteroides Peptococcus*) бактерий при БВ выше, чем у здоровых женщин. Общая концентрация бактерий во влагалище при БВ возрастает до 10^{11} в 1 мл. Большие концентрации этих микроорганизмов влекут за собой изменения в состоянии влагалища. Так, уменьшение содержания молочной кислоты, продуцируемой факультативными лактобациллами, приводит к повышению pH, что в свою очередь стимулирует рост анаэробных микроорганизмов. При увеличении бактериального роста при БВ возрастает продукция аномальных аминов факультативными анаэробами. Амины при увеличении вагинального pH становятся летучими, обуславливая типичный «рыбный» запах, усиливающийся при добавлении 10% раствора КОН во влагалищный секрет. Бактериальные полиамины вместе с находящимися во влагалище органическими кислотами (уксусной и сукциновой) оказывают цитотоксическое действие, вызывая отторжение эпителиальных клеток, что приводит к

обильным вагинальным выделениям. *Gardnerella vaginalis* способствует интенсификации процесса отторжения эпителиальных клеток, особенно в условиях алкалоза, обнаруживаемого при бактериальном вагинозе. В результате образуются патогномоничные «ключевые» клетки.

БВ является, как правило, полимикробным заболеванием. БВ в виде моно-инфекции протекает без признаков воспалительной реакции и лейкоцитов во влагалищном отделяемом. Отсутствие лейкоцитарной реакции связывают с продуктом метаболизма бактерий рода *Bacteroides* - сукцинатом, присутствующим в высоких концентрациях в вагинальных образцах у женщин с БВ, и с гемолизином гарднерелл, которые нарушают функциональную активность лейкоцитов и тем самым предотвращают выраженную воспалительную реакцию (Кудрявцева Л.В. и соавт., 2001).

Предрасполагающими факторами развития БВ являются осложнения течения беременности и родов, перенесенные воспалительные заболевания органов малого таза, длительное использование ВМС (более 5 лет), инфекционные процессы после аборт, заболевания шейки матки, дисгормональные расстройства, тяжелые соматические заболевания, иммунодефицитные состояния, длительное использование внутриматочных контрацептивов, антибиотиков, дисбиоз кишечника, высокая сексуальная активность, неблагоприятные социально-экономические условия жизни, несоблюдение личной гигиены, и др. С другой стороны, нитрозамины, являющиеся продуктами метаболизма облигатных анаэробов, служат кофакторами канцерогенеза и могут быть одной из причин развития диспластических и неопластических процессов в шейке матки (Reid G., 2006; Sweet R.L., 2000).

Основными клиническими проявлениями БВ являются обильные однородные выделения из влагалища, пенистые, слегка тягучие, белого или серого цвета с неприятным «рыбным» запахом, особенно после полового акта или во время менструации. Длительность существования этих проявлений может исчисляться годами. При длительно текущем процессе выделения приобретают желтовато-зеленоватую окраску, становятся более густыми, тягучими, нередко напоминают творожистую массу. Количество белей варьирует от умеренных до весьма обильных. Иногда отмечаются периодически возникающие зуд, дизурические расстройства, диспареуния. В 24-50% случаев БВ может протекать бессимптомно, без каких-либо клинических проявлений заболевания и диагноз может быть поставлен только на основании лабораторных методов исследования.

На сегодняшний день диагностика бактериального вагиноза не представляет трудностей: диагноз БВ может быть поставлен на основании 3-х из 4-х диагностических тестов, предложенных Amsel R. и соавт. (1983 г.):

1. Патологический характер вагинальных выделений.
2. pH вагинального отделяемого более 4,5.
3. Положительный аминный тест.
4. Выявление «ключевых» клеток при микроскопии влажных неокрашенных препаратов вагинального отделяемого и мазков, окрашенных по Граму.

Результаты проведенных исследований позволяют выделить 2 варианта клинического течения бактериального вагиноза: бессимптомное и с клиническими симптомами. У 50% женщин бактериальный вагиноз может протекать бессимптомно. При бессимптомном течении отсутствуют клинические проявления заболевания наряду с положительными лабораторными признаками. Остальные пациентки с бактериальным вагинозом, как правило, предъявляют жалобы на обильные выделения из половых путей белого или серого цвета, часто с неприятным запахом, описываемым как «рыбный», особенно после незащищенного полового акта или во время менструации. Поскольку семенная жидкость имеет рН 7,0, после эякуляции соответственно возрастает вагинальная рН, вследствие чего амины переходят в свободное состояние и, являясь летучими, обуславливают этот запах. Его усиление в связи с половым сношением служит определенным дифференциально-диагностическим признаком бактериального вагиноза. Длительность существования этих симптомов может исчисляться годами. При прогрессирующем процессе выделения приобретают желтовато-зеленоватую окраску, становятся более густыми, обладают свойством пениться, слегка тягучие и липкие, равномерно распределяются по стенкам влагалища. Количество белей варьирует от умеренных до весьма обильных.

Несмотря на многочисленные публикации, касающиеся вопросов терапии БВ, широкий арсенал предлагаемых схем лечения с использованием различных групп новых антибактериальных препаратов, лечение БВ остается одной из актуальных проблем гинекологии на современном этапе. Эффективность рекомендуемых схем лечения составляет 80-85%, а частота рецидивирования до 15-25%.

При всех методах лечения, основанных на использовании антибактериальных средств, отмечаются рецидивы, возникающие в различные сроки после лечения. По-видимому, это связано с тем, что антибиотикотерапия, ликвидируя условно-патогенные микроорганизмы, часто не создает условий для достаточно быстрого восстановления лактобактерий. В этой связи для лечения БВ более оправданным является комбинированное (интравагинальное и пероральное) использование синбиотических препаратов, включающих в свой состав пробиотические штаммы лактобактерий, бифидобактерий и комплекс пребиотиков, ввиду их многообразного позитивного действия, направленного на восстановление нормального биоценоза влагалища, а также на коррекцию сопутствующего кишечного дисбиоза. Неспособность антибиотиков снизить восприимчивость организма к повторной колонизации патогенами, а также негативное воздействие на качество жизни пациенток БВ делает необходимым поиск альтернативных средств терапии (Ellis, A.K., Verma, S., 2002).

Цель исследования: Изучение эффективности комплексного перорального и интравагинального приема синбиотических биокомплексов «Нормофлорины Л и Б» (производитель – ООО «Бифилукс») при лечении БВ.

Синбиотические препараты используют чаще на втором этапе лечения, после местного или системного применения антибиотиков. Эффективность

комплексного двухэтапного метода лечения вагинального дисбактериоза, по данным различных авторов, составила от 85,8% до 92,6%, частота рецидивов заболевания спустя 1-3 месяца после окончания лечения составляет от 4,4% до 13,2%. Терапевтический эффект препаратов, содержащих лактобактерии и бифидобактерии, связан со снижением pH вагинальной среды в процессе жизнедеятельности этих микроорганизмов, а также с антагонистической активностью их по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. На фоне применения синбиотиков может отмечаться также стимуляция роста индигенной флоры. В данном исследовании синбиотические биокомплексы применялись без предшествующей местной или системной антибактериальной терапии. Синбиотические биокомплексы «Нормофлорин Л» и «Нормофлорин Б», выпускаемые ООО «Бифилукс», содержат в своем составе активные живые клетки лактобактерий («Нормофлорин Л»), бифидобактерий («Нормофлорин Б») в количестве не менее 10^{10} в 1 мл, комплекс витаминов (B1, B2, B3, B6, B12, PP, C, E), микроэлементы (Fe, Cu, Ca, K, Na, Zn, Mg, Mn, F), органические кислоты, незаменимые аминокислоты, бактериоцины (антибиотикоподобные субстанции), перекись водорода и лизоцим, обеспечивающие антибактериальный эффект в отношении условно-патогенной флоры кишечника, ферменты, а также органический пребиотик лактит.

Терапевтический эффект препаратов, содержащих штаммы лактобактерии, основан в значительной степени на их иммуномодулирующей активности. Стимуляция иммуноглобулинпродуцирующих лимфоцитов, находящихся в стенке влагалища, под действием лактобактерии приводит к усилению выработки секреторных Ig A, защитное действие которых состоит в ингибции адгезии неиндигенных микроорганизмов, нейтрализации вирусов. Установлена активация перитонеальных макрофагов при пероральном введении лактобактерии. Препараты на основе лактобактерии у пациентов с хроническими заболеваниями повышают лизосомальный индекс лейкоцитов, уровни секреторных Ig A и другие параметры локального иммунитета. Действие лактобактерии на иммунную систему связывают, в первую очередь, с наличием в составе их клеточной стенки компонентов пептидогликана и тейхоевых кислот.

Дизайн исследования

Под наблюдением находились 15 женщин с бактериальным вагинозом в возрасте от 20 до 49 лет (средний возраст - $35,3 \pm 1,8$ лет). У всех больных диагноз БВ ставился на основании рекомендаций R.Amstel et al. (1983). Для постановки диагноза и оценки эффективности лечения все пациенткам обследуемой группы были проведены следующие обследования:

- клиническое (сбор жалоб, анамнеза, общий осмотр, специальное гинекологическое исследование, УЗИ матки и придатков);
- лабораторное (микроскопия мазка вагинального отделяемого, окрашенного по Грамму, на степень чистоты влагалищного содержимого и наличие «ключевых» клеток, pH-метрия влагалищного секрета, амино-тест). По показаниям проводились другие необходимые исследования и консультации специалистов.

Сопутствующая или фоновая патология была представлена хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза у 11 больных, диспластическими изменениями шейки матки – у 4, эктопией шейки матки – у 2 больных, хроническим тонзиллитом – у 4, хроническим холециститом – у 5, дисбиозом кишечника – у 9, хроническим пиелонефритом – у 4. У 2 больных в анамнезе регистрировались дисфункциональные маточные кровотечения, у 3 – нарушения менструального цикла, у 3 – выкидыши и у 2 – осложнения беременности и родов.

Открытое несравнительное исследование эффективности синбиотического биокомплекса «Нормофлорины Л и Б» для лечения БВ проведено в одном центре – гинекологическом отделении МСЧ завода «Резинотехника», являющемся клинической базой ГОУВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева». Препарат назначался интравагинально («Нормофлорин Л») на тампонах 1 раз в день в течение 10 дней и внутрь («Нормофлорин Л» утром 20 мл и Нормофлорин Б» вечером 20 мл) в течение 30 дней согласно зарегистрированным на территории России рекомендациям. Пациентки начали участие в исследовании сразу же после менструаций. Во время менструации влагалищные мазки не отбирались. Все мазки были отобраны либо раньше, либо позже менструаций. Это было предпринято во избежание влияния эстрогеновых пиков, приходящихся на середину цикла, которые могли стимулировать рост концентрации патогенов, а также исходя из имеющихся данных о том, что рецидивирующие урогенитальные инфекции имеют тенденцию возникать перед менструацией.

Концепция создания или укрепления бактериальной барьерной популяции во влагалище путем орального и вагинального применения пробиотических лактобацилл ранее была проверена с определенным успехом для предупреждения рецидивов БВ, включая кандидоз. В ранее проведенных исследованиях использование лактобацилл, вводимых непосредственно во влагалище, коррелировало с уменьшением риска развития БВ у женщин, имеющих повышенный риск его возникновения (Reid, G. Et al., 1995). Проведенные исследования показали, что эти пробиотические организмы могут колонизировать влагалище даже после орального приема и вымещать штамм *Gardnerella vaginalis*, представляющий основную причину БВ. Более того, применение некоторых штаммов лактобактерий у женщин с высокой восприимчивостью к рекуррентным урогенитальным инфекциям, никогда не приводило к дрожжевому вагиниту.

Lactobacillus rhamnosus GR-1 и *Lactobacillus fermentum* RC-14 и B-54 (штамм почти идентичный RC-14), как было показано ранее, колонизируют вагинальные пути и предупреждают инфекции мочевых путей у женщин после перорального применения и вагинального введения (Брюс и др., 1998). При непосредственном вагинальном применении, штаммы лактобактерий персистируют во влагалище в течение длительных периодов (Гардинер и др., 2002). Недавние исследования продемонстрировали возможность обнаружения штаммов лактобактерий в вагинальных путях после перорального приема, причем поступление во влагалище осуществляется с помощью микроб-

ной колонизации и восхождения из кишечника (Рейд, 2001). Это является предварительным доказательством того, что штаммы лактобактерий могут выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт человека, что представляет одно из требований, предъявляемых к кишечным пробиотикам.

Исследование Г.Рейд и соавт, (2002) подтверждает потенциальную эффективность перорального приема лактобацилл в качестве нехимиотерапевтического средства для восстановления и сохранения нормальной урогенитальной флоры и показывает, что требуемая доза составляет свыше 10^8 жизнеспособных организмов в день.

Появились доказательства, что определенные штаммы могут действовать эффективно при прямом введении во влагалище или когда они восходят из прямой кишки после перорального приема (Reid, 2001). Было показано, что лактобациллы введенные перорально, мигрируют во влагалище и вытесняют патогенную флору, при этом необходимая доза пробиотика составляет 10^8 КОЕ.

В настоящее время врачи акушеры-гинекологи имеют в своем арсенале широкий спектр различных препаратов для лечения бактериального вагиноза, обладающих антианаэробным действием. Следует отметить, что многие клиницисты сегодня отдают предпочтение влагалищному пути введения препаратов при лечении БВ, который не уступает по эффективности оральной терапии. Он является более предпочтительным, поскольку препараты локального действия вводятся непосредственно в очаг, при этом меньше вероятность развития побочных реакций. Препараты локального действия можно назначать беременным и женщинам, находящимся в периоде лактации, а также при экстрагенитальной патологии, когда системные препараты противопоказаны.

В проведенное исследование включены пациенты, не нуждающиеся в госпитализации. Включение пациентов в исследование проведено согласно следующим критериям включения/исключения:

Критерии включения.

1. Наличие клинически выраженного или бессимптомного БВ.
2. Согласие пациентки дать добровольное письменное согласие на участие в исследование, которые в состоянии понять смысл проводимого исследования и связанные с этим риски, проявившие желание до конца пройти все процедуры исследования в соответствии с протоколом и выполнять назначения исследователя.

Критерии исключения.

1. Пациентки, которые нуждаются в назначении системных антибиотиков или госпитализации в связи с осложнением основного заболевания или по иным причинам.
2. Прием антибактериальных препаратов менее чем за 3 месяца до начала настоящего лечения.
3. Наличие инфекций, передаваемых половым путем.
4. Использование вагинальных контрацептивов в виде таблеток или мазевых форм.

5. Острые или обострение хронич. воспалительных заболеваний во время лечения.

6. Пациентки, имеющие индивидуальную чувствительность к любому из компонентов исследуемого продукта.

7. Пациентки, принимающие участие в исследованиях по другим протоколам, или принимавшие участие в других исследованиях в последние 12 месяцев.

8. Отсутствие менструаций во время интравагинального применения препаратов.

9. Пациентки, которые не должны принимать участие в этом исследовании, по мнению исследователя.

Прекращение участия в исследовании.

Любая пациентка, проявившая желание, имела возможность прекратить исследование в любой момент без объяснения причины. Исследователь обязан был сделать соответствующую запись в документах исследования и дать оценку связи с исследуемым продуктом. Исследователь также должен был приложить усилия, чтобы убедить пациента в необходимости завершить исследование и получить необходимые данные. Все пациентки, завершившие исследование, включены в анализ эффективности. Включение в анализ данных пациенток, завершивших исследование раньше запланированного срока, решалось в индивидуальном порядке по окончании исследования.

Пациенты исследуемой группы проходили амбулаторное лечение, которое включало в себя в качестве основного курса интравагинальное («Нормофлорин Л» в виде тампона, обильно смоченного препаратом, разведенным 1:1 с кипяченой водой температуры тела 1 раз в день) и пероральное («Нормофлорин Л» 20 мл утром, «Нормофлорин Б» 20 мл вечером) использование синбиотического биокомплекса «Нормофлорины Л и Б». Курс перорального применения «Нормофлорины Л и Б» составил 30 дней, после чего (через 10 дней после завершения лечения) больным проводилось 1-е контрольное обследование, включавшее в себя клиническое (сбор жалоб, специальное гинекологическое исследование) и лабораторное обследование (микроскопия мазка вагинального отделяемого, окрашенного по Грамму, на степень чистоты влагалищного содержимого и наличие «ключевых» клеток, рН-метрия влагалищного секрета, амино-тест). 2-е контрольное исследование проводилось через 3 месяца после завершения курса лечения.

Критерии оценки результатов лечения:

Критериями эффективности лечения было клинико-лабораторное выздоровление сразу после лечения и отсутствие рецидива через 3 месяца после лечения.

Результаты исследования представлены в таблице.

В результате использования комбинированной методики, включающей в себя одновременное интравагинальное («Нормофлорин Л» в течение 10 дней 1 раз в день) и пероральное применение синбиотических биокомплексов «Нормофлорины Л и Б» (в течение 30 дней) у всех пациенток, страдающих БВ были ликвидированы к концу срока комбинированного лечения клиниче-

ские проявления заболевания. Исчезли влагалищные выделения, неприятный запах, жжение и зуд во влагалище. У 12 пациенток отчетливое клиническое улучшение отмечено сразу после окончания 10-дневного курса интравагинальных аппликаций Нормофлорина Л. Пролонгирование терапии за счет перорального использования Нормофлоринов Л и Б позволило добиться положительного результата у всех пациенток, причем достигнутый клинический эффект сохранялся в течение 3 месяцев после завершения лечения. Кроме того, все женщины, участвующие в исследовании отметили одновременное улучшение работы кишечника и общего состояния.

Таблица

Эффективность лечения бактериального вагиноза.

Диагностические критерии	До лечения	После лечения	Через 3 месяца после лечения
Жалобы	есть	нет	нет
рН-метрия	>4,5	кислая	кислая
Амино-тест	положительный	отрицательный	отрицательный
Ключевые» клетки в мазке по Грамму	есть	нет	нет

В результате исследования было выявлено, что ежедневный прием Нормофлоринов Л и Б в пероральной форме в течение 30 дней в сочетании с интравагинальным введением Нормофлорина Л в течение первых 10 дней лечения не приводит к каким-либо побочным эффектам.

Таким образом, комбинированное применение синбиотических биокомплексов Нормофлорины Л и Б позволило не только добиться отчетливого клинического эффекта у всех включенных в исследование пациенток БВ, но и сохранить его в течение 3-месячного периода наблюдения.