

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, НА КАЧЕСТВО НЕОВЛАГАЛИЩНОЙ МИКРОФЛОРЫ У М→Ж ЖЕНЩИН-ТРАНССЕСУАЛОВ

Ulrike Kaufmann^a, Konrad J. Domig^b, Christina I. Lippitsch^b, Manuel Kraler^b, Julian Marschalek^a, Wolfgang Kneifel^b, Herbert Kiss^{a,*}, Ljubomir Petricevic^a

^a Кафедра акушерства и гинекологии, Венский медицинский университет, Waehringer Guertel 18-20, A-1090, Вена, Австрия

^b Кафедра теоретических основ и технологии пищевой промышленности, ВОКУ, - Венский университет природных ресурсов и прикладных наук, Muthgasse 18, A-1190, Вена, Австрия

Ключевые слова:

пробиотики, пероральная терапия, женщины-транссексуалы, неовлагалище, лактобациллы

Цель: поскольку лактобактерии обнаруживаются в неовлагалище очень небольшого количества женщин-транссексуалов, мы провели данное исследование с целью определить, оказывает ли какой-либо измеримый эффект пероральный прием препарата, содержащего четыре штамма лактобацилл, на неовлагалищную флору женщин-транссексуалов.

Дизайн клинического исследования: 60 М Ж женщин-транссексуалов с неовлагалищем, созданным из тканей пениса и мошонки, были рандомизированы на две группы. Женщины в экспериментальной группе (n = 33) перорально принимали капсулы с пробиотиком, а женщины в контрольной группе (n = 27) принимали плацебо на протяжении 7 дней. Мазки из неовлагалища брали до и после терапии.

Результаты: при сравнении первых и вторых мазков мы обнаружили значительное улучшение по шкале Ньюджента у 16 (48,5%) женщин из экспериментальной группы в сравнении с низким показателем улучшения в контрольной группе – 4 (14,8%) (p < 0,006). После перорального введения лактобацилл значительно обогатили неовлагалищную микрофлору по сравнению с результатом от приема плацебо. В экспериментальной группе наблюдалось увеличение на 10 000 ± 600 колониеобразующих единиц (КОЕ) презумптивных лактобацилл в сравнении с увеличением на 1600 ± 100 КОЕ в контрольной группе (p < 0,0001). По результатам проведения ПЦР в реальном времени (копий/мл) в экспериментальной группе количество лактобацилл увеличилось на 1400 ± 100 (копий/мл) и в контрольной группе – на 300 ± 100 (копий/мл) (p < 0,0001).

Вывод: после перорального введения штаммов лактобацилл у женщин-транссексуалов наблюдалось улучшение влагалищной лактобациллярной микрофлоры.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. Все права защищены.

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлора М→Ж женщин-транссексуалов – это сложный симбиоз аэробных и анаэробных видов микроорганизмов с очень ограниченным количеством лактобацилл. Она имеет существенное сходство с патологической влагалищной микрофлорой, которую можно наблюдать при бактериальном вагинозе (БВ) [1,2]. Weyers и др. отметили, что хотя у женщин-транссексуалов уровни сывороточного эстрадиола сравнимы с уровнями сывороточного эстрадиола у женщин в постменопаузе, которые проходят заместительную терапию эстрогенами, их неовлагалищная среда не поддерживает рост лактобацилл [1]. В одном исследовании [1] всего одна из тридцати женщин-транссексуалов имела неовлагалищную колонизацию лактобацилл. В другом исследовании, проведенном с участием женщин-транссексуалов, те же авторы [2] выявили 4% уровень колонизации неовлагалища лактобациллами.

Некоторые виды бактерий могут колонизировать как желудочно-кишечный тракт, так и половые пути. Прямая кишка может играть важную роль в качестве источника микроорганизмов, за-

сеяющих влагалище [3]. Кишечник выполняет роль резервуара для колонизации влагалища *Lactobacillus* spp., таким образом, способствуя поддержанию нормальной влагалищной микробиоты [4,5]. Недавнее исследование показало, что 80% беременных женщин и 40% женщин в постменопаузе имеют одинаковые виды *Lactobacillus* во влагалище и прямой кишке [6]. Благодаря их анатомической и гормональной схожести, М→Ж транссексуалы, получающие заместительную гормональную терапию, могут быть сравнимы с общей женской популяцией для проведения исследований по колонизации влагалища лактобациллами.

Некоторые патогенные бактерии, инфицирующие женские мочеполовые пути, выходят из кишечной микробиоты женщины и поднимаются вдоль промежности во влагалище. При местном замещении с использованием лактобацилл было отмечено значительное восстановление влагалищной микрофлоры, ведущее к существенному сокращению случаев повторных проявлений инфекций мочеполовых путей [7,8]. Reid и др. использовали видоспецифическую ПЦР-амплификацию для демонстрации того, что штаммы *L. rhamnosus* и *L. fermentum* могут заселять влагалище

*Автор, которому необходимо отправлять корреспонденцию: Department of Obstetrics and Fetomaternal Medicine, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20, 1090 Vienna, Austria, Tel.: +43 1 40400 2822; fax: +43 40400 2861. E-mail: herbert.kiss@meduniwien.ac.at (H.Kiss)

при пероральном приеме, а также они обнаружили значительный рост влагалищных лактобацилл у субъектов, получающих лечение в сравнении с контрольной группой [9]. Morelli и др., используя методы генетической идентификации, также показали, что штаммы *L. rhamnosus* и *L. fermentum* могут заселять влагалищную среду даже при пероральном приеме [10]. Оба исследования проводились при участии здоровых женщин в постменопаузе. Пероральный прием препаратов на основе лактобацилл – это новая концепция восстановления нормальной микрофлоры влагалища [11]. Мы предполагаем, что прямая кишка может играть важную роль в формировании неовлагалищной микрофлоры у женщин-транссексуалов, и что выбранные кишечные лактобациллы также колонизируют неовлагалище, поднимаясь вдоль промежности между анусом и влагалищем. Мы провели данное проспективное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с целью определить, оказывает ли пероральный прием препарата на основе четырех штаммов лактобацилл измеримый эффект на неовлагалищную микрофлору женщин-транссексуалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное проспективное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование было проведено с разрешения Комитета по этике Венского медицинского университета (EK 982/2010) в соответствии с Хельсинской декларацией и «Правилами надлежащей клинической практики». Перед включением в исследование от всех участников было получено информированное согласие. В исследовании на постоянной основе принимали участие М→Ж женщины-транссексуалы, отобранные среди амбулаторных пациентов Венского медицинского университета. Все, включенные в исследование пациенты, подвергались операции по изменению пола (ОИП) методом «пенальной инверсии» [12] как минимум за 1 год до начала исследования. Все женщины-транссексуалы проходили лечение в соответствии со стандартами Всемирной профессиональной ассоциации по здоровью трансгендеров (WPATH) [13]. Кри-

Рис. 1. Последовательность этапов исследования.



териями исключения из исследования были клинические признаки инфекции влагалища или мочевыводящих путей, патологические выделения из неовлагалища, неоплазия, кровотечение, диарея, запор, ректальные патологии, включая геморрой, а также антибиотикотерапия меньше чем за 4 недели до начала исследования (рис. 1).

На начальном этапе, после получения письменного информированного согласия, у каждой М→Ж женщины-транссексуала был взят исходный неовлагалищный мазок и нанесен на предметное стекло. Мазки были окрашены по Граму и оценены по 10-бальной шкале Ньюджента [14] в центральной опытной лаборатории. Все участники были разделены на группы посредством сгенерированного компьютером рандомизационного списка. Женщины-транссексуалы в экспериментальной группе перорально принимали пробиотические капсулы 2 раза в день в течение 7 дней; каждая капсула содержала 4 лиофилизированных штамма *Lactobacillus*, относящихся к видам *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* (Табл. 1). Женщины-транссексуалы в контрольной группе перорально принимали идентичное по виду плацебо на основе картофельного мальтодекстрина 2 раза в день в течение 7 дней. Второй и третий мазки из неовлагалища для оценки по шкале Ньюджента и культурального анализа были взяты на следующий день после приема последней капсулы и через 2 недели после него.

Табл. 1

ФЛОРИУМ

Состав	Гарантированное количество жизнеспособных клеток (КОЕ/доза)
<i>L. crispatus</i> LbV88 (DSM 22566)	1 x 10 ⁸
<i>L. rhamnosus</i> LbV96 (DSM 22560)	1 x 10 ⁸
<i>L. jensenii</i> LbV116 (DSM 22567)	0,2 x 10 ⁸
<i>L. gasseri</i> LbV150N (DSM 22583)	0,3 x 10 ⁸
Картофельный мальтодекстрин	
Нерастворимое пищевое волокно	
Диоксид кремния	

Для культурального и молекулярного анализа лактобацилл исследуемый материал помещали в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (ФБР) и затем встряхивали в течение 1 мин. 100 μ л аликвотной пробы разбавили в 10-кратном объеме ФБР, и количество жизнеспособных клеток презумптивных лактобацилл определяли, помещая на MPC агар с добавлением 0,5 г/л цистеин-гидрохлорида и инкубируя при 37°C в анаэробных условиях (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) в течение 48 ч.

Оставшиеся фосфатно-буферные суспензии были заморожены при -80°C и после этого подвергнуты процессу экстракции ДНК и количественному анализу посредством ПЦР в режиме реального времени, для проведения которого использовали набор Bacterial Vaginosis Real-TM Quant торговой марки Sacace (Sacace Biotechnologies Srl, Комо, Италия) для прибора RotorGene™ 3000/6000/Q (Corbett Research, Мортлейк, Австралия, Qiagen, Хильден, Германия) согласно инструкции изготовителя. Набор включает в себя процедуру экстракции ДНК из исследуемого образца и ПЦР-анализа в режиме реального времени на основе меченых флуоресцентным красителем проб, специфичных для ДНК всех бактерий (*Sy5/красный*), лактобацилл (*ROX/оранжевый*), *Gardnerella vaginalis* (*FAM/зеленый*) и *Atopobium vaginae* (*JOE/желтый*). Результаты для презумптивных лактобацилл приведены в количестве копий на 1 мл.

Критериями эффективности было изменение исходного индекса Ньюджента в конце лечения (улучшение или отсутствие улучшения во втором мазке), а также концентрация лактобактерий как по культуре, так и по ПЦР в режиме реального времени до и после ле-

чения.

Статистический анализ

Между терапевтическими группами по критерию хи-квадрата было проведено сравнение доли субъектов с изменениями в исходном индексе на момент окончания исследования. Средние баллы по шкале Ньюджента сравнивали, применяя описательный метод и используя U-критерий Манна-Уитни.

Так как данное исследование было пилотным, и отсутствовала какая-либо историческая оценка процентной доли участников, имевших очевидный клинический результат после лечения лактобациллами, расчет объема выборки основывался на приблизительно рассчитанном количестве по основному критерию оценки эффективности, т.е. улучшению показателей по шкале Ньюджента. Учитывая потенциальную клиническую значимость и улучшенную оценку мазков по шкале Ньюджента, у более чем 50% женщин в экспериментальной группе, а также возможное улучшение у максимум 5 женщин в контрольной группе (16,7%), объем выборки 30 субъектов на группу был признан достаточным для того, чтобы показать статистически значимое превосходство с показателем эффективности минимум 80%. Для статистического анализа использовали программу SPSS версии 11.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с декабря 2011 г. по март 2012 г. в общей сложности 75 М→Ж женщин-транссексуалов прошли обследование перед включением в исследование. Средний возраст женщин – 41,2 ± 13 лет, средний рост – 176,5 ± 6,4 см, средний вес – 82,3 ± 19,9 кг; и средний промежуток времени, прошедший после ОИП – 5,2 ± 4,8 лет. Последовательность этапов, проходимых участниками, в течение проведения исследования изображены на рис. 1.

60 женщин-транссексуалов, отвечавших критериям отбора, участвовали в финальном анализе: 33 в экспериментальной и 27 в контрольной группе. На основе результатов первого мазка из неовлагалища, индекс Ньюджента 0-3 был идентифицирован у 10 женщин (30%) в экспериментальной группе и у 8 женщин (30%) в контрольной группе. Патогенная бактериальная микрофлора неовлагалища с индексом Ньюджента 4-10 в первом мазке была обнаружена у 23 женщин (70%) в экспериментальной группе и у 19 женщин (70%) в контрольной группе, без статистической разницы между группами ($p < 0,371$).

Анализ первого мазка показал средний балл по шкале Ньюджента 5 в обеих группах. Сравнение различий в индексе Ньюджента между первым и вторым мазком (после недельного приема Флоридума) показало значительную разницу ($p < 0,02$) в -0,18 в экспериментальной группе и осталось практически на том же уровне (+0,92) в контрольной группе.

Значительное улучшение показателей по шкале Ньюджента на-

блюдалось у 16 женщин (48,5%) в экспериментальной группе и у 4 женщин (14,8%) в контрольной группе ($p < 0,006$; табл. 2).

Подтверждением выше сказанному явились результаты исследования концентрации презумптивных лактобацилл во втором мазке по сравнению с первым. В экспериментальной группе было отмечено увеличение количества колониеобразующих единиц (ОЕ) презумптивных лактобацилл на $10\ 000 \pm 600$ КОЕ, по сравнению с увеличением на 1600 ± 100 КОЕ в контрольной группе ($p < 0,0001$). При проведении ПЦР-анализа в режиме реального времени (копии/мл) наблюдалось увеличение количества лактобацилл во втором мазке по сравнению с первым в экспериментальной группе на 1400 ± 100 копий/мл и на 300 ± 100 копий/мл в контрольной группе ($p < 0,0001$) (рис.2).

Когда все женщины-транссексуалы с нормальной микрофлорой неовлагалища (0-3 баллов по шкале Ньюджента) на исходном уровне были исключены ($n=18$), улучшение показателей по шкале Ньюджента наблюдались в экспериментальной группе ($n=23$), в отличие от контрольной ($n=19$). При рассмотрении исключительно женщин с бактериальным вагинозом на исходном уровне (т.е. количество баллов по шкале Ньюджента >7 ; $n=22$), наблюдалось изменение состояния микрофлоры на промежуточное в экспериментальной группе, в отличие от контрольной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного проспективного рандомизированного контролируемого исследования показывают, что пероральный прием *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* способствовал значительному улучшению микрофлоры неовлагалища и уменьшению баллов по шкале Ньюджента в группе женщин-транссексуалов. Также, микрофлора стала значительно более насыщенной лактобациллами после их перорального применения, по сравнению с приемом плацебо. Комбинация *Lactobacillus spp.*, использованная в данном исследовании, является единственной опубликованной в качестве физиологической смеси женской вагинальной лактобациллярной микрофлоры [15]. Для семидневного лечения мы использовали инновационную пробиотическую лактобациллярную композицию, содержащую четыре самых распространенных лактобактерии, выделенных из микрофлоры влагалищ здоровых женщин [15]. Weyers и др. отметили, что колонизация неовлагалища лактобактериями у женщин-транссексуалов минимальна [1, 2]. По утверждению Ньюджента, промежуточная микрофлора влагалища определяется сокращением, а БВ (бактериальный вагиноз) – отсутствием лактобацилл; при этом, в обоих случаях отмечается присутствие грамотрицательных бактерий [14]. Небольшое количество публикаций на тему стандартной неовлагалищной микрофлоры и практически полное отсутствие подтверждений наличия молочнокислых бакте-

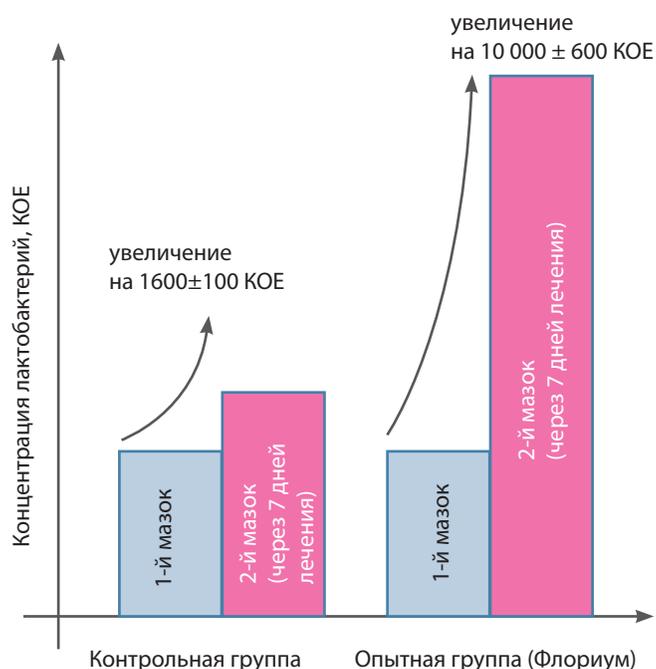
Табл. 2. Улучшение оценки по шкале Ньюджента между 1 и 2 мазком и между 2 и 3 мазком в экспериментальной и контрольной группах.

	Исследуемый препарат		Плацебо	
	N (кол-во)	%	N (кол-во)	%
Мазок 1 ^{ый} против 2 ^{го} ^a				
Значительное улучшение	16	48,5	4	14,8
Отсутствие улучшения	17	51,5	22	81,5
Не поддающийся оценке	0	0	1	3,7
Итого	33	55,0	27	45,0
Мазок 2 ^{ой} против 3 ^{го} ^b				
Значительное улучшение	7	21,2	9	33,3
Отсутствие улучшения	25	75,8	15	55,6
Не поддающийся оценке	1	3	3	11,1
Итого	28	53,8	24	46,2

^a Хи-квадрат критерий: $p = 0,006$

^b Хи-квадрат критерий: $p = 0,204$

Рис. 2. Увеличение количества лактобактерий во втором мазке по сравнению с первым в опытной и контрольной группах.



рий в половых путях транссексуалов усложняет проведение исследований, касающихся обозначенной группы людей. Хотя женщины-транссексуалы имеют нормальное строение женского организма, у них отсутствует матка, а также связь между неовлагалищем и тазовой полостью, в связи с чем риск воспалительных заболеваний тазовых органов у них низкий. Вследствие этого у нас была возможность включить в исследование всех женщин-транссексуалов без клинических признаков инфекции, а также с бессимптомным БВ. Насколько нам известно, данное исследование является первым в своем роде, позволившим дать прямую оценку сравнительной эффективности перорального приема пробиотических лактобацилл и плацебо по отношению к БВ.

Желудочно-кишечный тракт играет важную роль в качестве резервуара для колонизации влагалища *Lactobacillus spp.* [4-6]. Показано, что как влагалищное, так и пероральное введение лактобацилл улучшает влагалищную микрофлору женщин как в предменопаузе, так и в постменопаузе [3,9-11]. Результаты данного исследования указывают на то, что лактобациллы, принимаемые перорально, оказывают схожий эффект на неовлагалищную микрофлору женщин-транссексуалов. Deskриптивный анализ разницы в количестве баллов по шкале Ньюджента показал сокращение последнего на -0,18 в экспериментальной группе и увеличение на +0,92 в контрольной группе.

Мы отметили улучшение показателя по шкале Ньюджента у 48,5% женщин в экспериментальной группе, по сравнению со всего 14,8% в контрольной группе. Концентрации лактобацилл, оцененные культуральным методом, а также ПЦР-анализом в режиме реального времени, были в 5-6 раз выше в экспериментальной, чем в контрольной группе; при этом учитывается статистическая значимость данных различий.

Расчет объема выборки в данном исследовании основывался на уровнях колонизации неовлагалищ лактобациллами, которые, согласно печатным источникам, доходят до 4% [1,2]. Однако, в данном исследовании 30% женщин в обеих (экспериментальной и контрольной) группах имели нормальную лактобациллярную микрофлору (количество баллов по шкале Ньюджента ≤3). Это было неожиданным открытием, контрастирующим с современной литературой [1,2]. Так как нельзя ожидать, что пероральное введение лактобацилл изменит неовлагалищную микрофлору, в которой преобладают лак-

тобактерии, эта неожиданно высокая доля женщин с нормальной лактобациллярной флорой могла привести к недооценке лечебного эффекта. Вследствие этого мы провели подгрупповой анализ, в котором участвовали только женщины с исходным баллом по шкале Ньюджента >4, соответствующим или промежуточной микрофлоре или БВ. И даже в этом случае, после 7-дневного лечения, основанного на пероральном приеме лактобацилл, мы обнаружили улучшение показателей по шкале Ньюджента в экспериментальной группе и никакого изменения в контрольной группе. Результаты данного подгруппового анализа сопоставимы с результатами одного из наших предыдущих исследований по эффективности использования лактобацилл в лечении женщин в постменопаузе, которые показали улучшение по индексу Ньюджента [11]. Однако, в отличие от предыдущего исследования, в котором лечение с применением лактобацилл длилось 14 дней, улучшение в нынешнем исследовании было отмечено уже спустя 7 дней после начала перорального приема лактобацилл. Повторное увеличение баллов по шкале Ньюджента через 2 недели после окончания пероральной терапии указывает на то, что продление пероральной пробиотической терапии может быть необходимо для поддержания микрофлоры, в которой доминируют лактобациллы.

Подводя итог, следует отметить, что данное, первое в своем роде, исследование по вопросу действия пероральных пробиотиков на неовлагалищную микрофлору женщин-транссексуалов показало, что пероральный прием лактобацилл приводит к значительному улучшению показателей по шкале Ньюджента и изменению неовлагалищной микрофлоры. Данные наблюдения соответствуют предыдущим результатам, полученным в ходе исследования, проведенном среди женщин в пред- и постменопаузе. Увеличение количества баллов по шкале Ньюджента спустя две недели после окончания пероральной терапии возможно говорит о необходимости продления пероральной пробиотикотерапии для поддержания насыщенности микрофлоры лактобациллами. В дополнение к этому, данное исследование показывает, что при бессимптомном БВ за

7 дней перорального введения лактобацилл может быть восстановлена нормальная микрофлора.

ВЫВОДЫ

1. Пероральный прием комбинации лактобактерий *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.jensenii* и *L.rhamnosus* (Флориум) приводит к заселению интактного неовлагалища нормальной микрофлорой уже за 1 неделю приема.
2. Рекомендуемая схема применения Флориума – по 1 капсуле 2 раза в день на протяжении одной недели.
3. Флориум – эффективный симбиотик, рекомендуемый для использования в гинекологической и терапевтической практике для профилактики и устранения бактериального вагиноза.



№05.03.02-03/8238.