

На правах рукописи

ЧЕРКАСОВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА

**ВЛИЯНИЕ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВЛАГАЛИЩА НА
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВАГИНАЛЬНОГО ПАТОЦЕНОЗА
К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

1.5.11. Микробиология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Оренбург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Оренбургском федеральном исследовательском центре Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), в обособленном структурном подразделении Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН)

Научный руководитель:

Сгибнев Андрей Викторович - доктор биологических наук, доцент (03.02.03 - Микробиология).

Официальные оппоненты:

Ворошилина Екатерина Сергеевна - доктор медицинских наук (03.02.03 – Микробиология), профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Червинец Юлия Вячеславовна - доктор медицинских наук, профессор (03.02.03 – Микробиология), заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ часов на заседании совета по защите диссертаций 24.1.445.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИКВС УрО РАН - обособленном структурном подразделении ОФИЦ УрО РАН (г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, каб. 311) и на сайте ОФИЦ УрО РАН <https://orennc.ru/> (в разделе «Диссовет»).

Автореферат разослан: «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
доцент

Перунова Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Микробиота различных биотопов организма человека может формировать биоценозы по типу нормоценоза или патоценоза, которые характеризуются определенным набором микрoэкологических параметров. С одной стороны состав микробиоты конкретного биотопа определяется биохимическими, биофизическими и иммунологическими параметрами окружающей среды, а с другой стороны жизнедеятельность этих микроорганизмов влияет на микрoэкологическое состояние в пределах этого биотопа (Zhou X., 2004). Как нормоценозы, так и патоценозы могут отличаться своей устойчивостью к неблагоприятным факторам. Одним из примеров устойчивого микробного сообщества нижних отделов женского репродуктивного тракта является патоценоз, сформированный трихомонадами и микроорганизмами, ассоциированными с бактериальным вагинозом (БВ), такими как *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus spp.*, *Prevotella spp.* (Africa C. W. J. и др., 2014; Gelber S. E. и др., 2008; Onderdonk A. B. и др., 2016; Rybus V., Onderdonk A. B., 1997). Клиническим проявлением такого патоценоза является трихомониаз, протекающий на фоне бактериального вагиноза (БВ). Полагают, что стабильность этого микробного сообщества объясняется не только индивидуальной устойчивостью микроорганизмов к антимикробным препаратам, но и является результатом симбиотических взаимоотношений между БВ-ассоциированными микроорганизмами и трихомонадами (Kissinger P., 2015).

Особенностью трихомониаза, протекающего на фоне БВ, является дефицит или отсутствие лактобацилл, которые являются естественным сдерживающим фактором инфекций, передающихся половым путем (Hillier S. L. и др., 2007). Это и данные о том, что дефицит нормальной микрофлоры обуславливает низкую результативность антимикробной терапии (Spurbeck R.R., Arvidson C.G., 2011), стали побуждением для изучения влияния вагинальных лактобацилл на чувствительность условнопатогенных микроорганизмов к антибиотикам. При этом был обнаружен феномен потенцирования действия антибиотиков метаболитами нормальной микрофлоры (Sgibnev A., Kremleva E., 2017). Это с одной стороны открывает перспективы повышения эффективности терапии воспалительных заболеваний, а с другой – заставляет задуматься о роли микробных метаболитов в обеспечении устойчивости патологических микробных сообществ в нижних отделах женского репродуктивного тракта к неблагоприятным факторам, в частности к антимикробным веществам.

Цель исследования – оценить влияние микроэкологических факторов вагинального биотопа на чувствительность патогеноза «*Trichomonas vaginalis* / БВ-ассоциированные микроорганизмы» к антимикробным препаратам.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (пероксида водорода, лактата и сурфактантов) на чувствительность *T. vaginalis* и БВ-ассоциированных микроорганизмов к антимикробным препаратам.

2. Оценить эффективность совместного применения антимикробных и пробиотических препаратов у пациенток с бактериальным вагинозом и трихомониозом.

3. Проанализировать влияние совместного применения антипротозойных препаратов и раствора, содержащего ионы двухвалентного железа на эффективность элиминации *T. vaginalis* у женщин.

Научная новизна работы

Впервые показано, что возможно управление устойчивостью вагинального патогеноза к антимикробным препаратам посредством изменения микроэкологических факторов вагинального биотопа.

Установлена зависимость эффективности элиминации *T. vaginalis* от видового состава микробиоты влагалища. Так, наличие лактобацилл в составе микробиоты влагалища в количестве, приближающемся к показателям нормы, способствует более эффективной элиминации трихомонад в отличие от случаев трихомониоза, протекающего на фоне БВ.

Впервые показано, что увеличение метаболической активности бактерий в биопленках под влиянием метаболитов вагинальных лактобацилл является возможной причиной повышения чувствительности биопленкообразующих бактерий к антимикробным препаратам.

Продемонстрировано, что предварительный индивидуальный подбор пробиотического штамма на основании концентрации обнаруживаемой АТФ, и его совместное применение с антимикробным препаратом определяет эффективность терапии БВ и значительно снижает риски рецидива (положительное решение на выдачу патента по заявке на изобретение № 2022121049/14(044359) «Способ лечения бактериального вагиноза»).

Доказана эффективность применения раствора, содержащего ионы двухвалентного железа, в терапии трихомонадной инфекции у женщин (патент РФ на изобретение №2726123).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования имеют как теоретическое, так и практическое значение. Полученные в работе данные расширяют представление о роли микробиоты в устойчивости патocenоза нижних отделов женского репродуктивного тракта к антимикробным препаратам.

Практическая ценность подтверждается разработанным методом индивидуального подбора пробиотического штамма для терапии БВ. Помимо этого, было доказано, что эффективность элиминации *T. vaginalis* напрямую зависит от влияния микробного окружения. Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике. Практически ориентированным итогом проведенных исследований стал патент РФ на изобретение: №2726123 «Способ лечения трихомониаза у женщин». Получено положительное решение о выдаче патента по заявке на изобретение на изобретение № 2022121049/14(044359) «Способ лечения бактериального вагиноза». Материалы диссертации используются в практическом здравоохранении на базе Клиники адаптационной терапии ФГБОУ ВО "ОрГМУ" МЗ РФ (акт внедрения от 20.07.2023), Лечебно-оздоровительное учреждение «Санаторий Гай» (акт внедрения от 20.07.2023).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. В работе использовались современные бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические методы исследования, математические и статистические методы обработки данных. Протоколы клинических исследований были одобрены локальным Комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России (протокол №165 от 10.03.2017 и протокол №212 от 29.10.2018 г.)

Положения, выносимые на защиту

1. Снижение устойчивости *T. vaginalis* и БВ-ассоциированных микроорганизмов к антимикробным препаратам является следствием изменения микрoэкологических параметров, возникающего в ответ на увеличение количества нормобиоты и ее метаболитов.

2. Увеличение чувствительности *T. vaginalis* и БВ-ассоциированных микроорганизмов к антимикробным препаратам связано с усилением их метаболической активности в результате изменения микрoэкологических факторов вагинального биотопа.

3. Способность вагинальной нормобиоты модулировать чувствительность участников патocenоза «*T. vaginalis* / БВ-ассоциированные микроорганизмы» к антимикробным веществам является основой для создания способов лечения инфекций и дисбиотических состояний вагинального биотопа.

Степень достоверности результатов

Все исследования проводили в трех повторностях и в трехкратном воспроизведении. При статистической обработке полученных результатов проверка нормальности распределения данных проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых $n > 50$) или критерия Шапиро-Уилка (при $n < 50$). Количественные признаки представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (σ). Для оценки достоверности различий между группами сравнения и группами исследования в случае нормального распределения количественных данных использовали t -критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей, в других случаях непараметрический U -критерий Манна-Уитни. В случае альтернативных признаков определяли долю объектов в выборке, обладающих этим признаком. Доли различных выборок сравнивали друг с другом посредством критерия хи-квадрат Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса. Исследование взаимосвязи между признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена (r).

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на IX-й Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (25-27 сентября 2018 г. – г. Оренбург); III-ей Всероссийской научной конференции с элементами научной школы для молодых ученых и специалистов «Эндогенные бактериальные инфекции: клинико-микробиологические и иммунологические аспекты» (16-18 сентября 2019 г. – г. Оренбург); межрегиональном медицинском форуме «Актуальные вопросы врачебной практики. Сердце Евразии» Актуальные вопросы акушерства и гинекологии (14-16 октября 2020 г. – г. Оренбург); X Российской научной конференции с международным участием посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологии (20-22 сентября 2023 г. – г. Оренбург).

Апробация работы состоялась 27 июня 2023 г. на заседании Ученого совета ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (протокол № 5 от 27.06.2023 г.).

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея и планирование научной работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, статистическая обработка первичных данных проводились совместно с научным руководителем д.б.н., доцентом А.В. Сгибневым. Получение и интерпретация данных исследований, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялось соискателем лично. Клиническая часть исследований была проведена при участии врачей акушеров-гинекологов Клиники адаптационной терапии ФГБОУ ВО "ОрГМУ" МЗ РФ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 работы, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, 1 патент РФ на изобретение, 1 статья - РИНЦ.

Связь работы с научными программами

Тема диссертации включена в план НИР «Роль микробного фактора в функционировании физиологических систем организма человека» № гос. регистрации 116021510073. Часть исследования выполнена в рамках гранта программы «УМНИК-2018».

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц и 32 рисунка. Список литературы содержит 168 источников, из них 155 публикаций в отечественных и зарубежных журналах, 11 патентов, 2 диссертации.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. А.В. Сгибневу за неоценимую помощь в проведении исследований на всех этапах работы, ценные советы и рекомендации. Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н. Е.А. Кремлевой и к.м.н. Ю.С. Щетининой за помощь в организации и реализации клинической части исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании были использованы 53 штамма *Trichomonas vaginalis*, 68 штаммов *Gardnerella vaginalis*, 1 штамм *Mobiluncus spp.*, 1 штамм *Prevotella bivia*, 46 штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из нижнего отдела репродуктивного тракта 167 женщин, проходивших обследование в Клинике адаптационной терапии ФГБОУ ВО "ОрГМУ" МЗ РФ, из них 46 женщин с нормоценозом, 68 - с рецидивирующим бактериальным вагинозом, 53 - с трихомониазом. Кроме того, в рамках исследования был использован штамм лактобацилл *Lactobacillus casei rhamnosus 35*, выделенный из пробиотического препарата Лактожиналь® и 3 штамма *Lactobacillus acidophilus*, выделенные из пробиотиков Лактонорм®, Экофемин®, Гинофлор®. В исследовании приняли участие: 30 женщин с бактериальным вагинозом, 230 женщин с трихомониазом, 40 женщин с трихомониазом и бактериальным вагинозом.

Исследование было одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России (протокол №165 от 10.03.2017 и протокол №212 от 29.10.2018 г.) и выполнялось в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской Декларации.

Выделение и идентификацию микроорганизмов производили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств (Берджи, 1997).

Определение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата в отношении исследуемых культур осуществлялось по задержке роста тест-штаммов в жидкой питательной среде методом микроразведений (Бондаренко В.М. и др., 2010). Определение минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов в отношении микроорганизмов в биопленке осуществляли на основании способности живых клеток восстанавливать краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид до нерастворимого формазана с пурпурной окраской (Sieuwerts A.M. et al., 1995).

В исследовании были использованы бесклеточные метаболиты лактобацилл, которые в тексте работы называли метаболитами. Метаболиты лактобацилл получали из бульонных культур согласно ранее описанной методике (Sgibnev A.V. et al., 2015). Продукцию сурфактантов подтверждали наличием эмульгирующей активности (Willumsen P.A. et al., 1996). Для определения концентрации молочной кислоты в супернатантах использовали наборы D-Lactate Assay Kit, L-Lactate Assay Kit (Sigma Aldrich Co). Концентрацию пероксида водорода определяли с использованием тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) и

пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich). Для исключения влияния пероксида водорода, сурфактантов, молочной кислоты, бактериоцинов супернатанты лактобацилл обрабатывали каталазой (10 мг/мл), смесью хлороформ/метанол (2:1 об/об), раствором 6 N NaOH, протеиназой К (20 мг/мл) и трипсином (20 мг/мл), соответственно, и стерилизовали фильтрованием (0,22 μ m, Millipore).

Способность микроорганизмов образовывать биопленки определяли в 96-луночных планшетах путем окрашивания раствором кристаллического фиолетового согласно ранее описанному методу George A. O'Tool в 1998 г.

Для **оценки влияния метаболитов лактобацилл на чувствительность *T. vaginalis* и *G. vaginalis* к метронидазолу *in vitro*** к двухсуточным культурам трихомонад вносили раствор метронидазола и один из метаболитов лактобацилл, после чего инкубировали в течение 48 часов в термостате при температуре 37 °С. Оценку и подсчет количества подвижных форм *T. vaginalis* осуществляли при помощи камеры Горяева. К двухсуточным бульонным культурам и биопленкам *G. vaginalis* вносили раствор метронидазола и один из метаболитов лактобацилл, после чего инкубировали при 37 °С в течение 48 часов в анаэробных условиях. Эффективность уничтожения микроорганизмов в биопленках оценивали при помощи высева на Columbia Blood Agar Base (HiMedia, Индия) с добавлением стерильной дефибринированной крови барана (до 5 % об/об).

В исследовании использовали метаболиты лактобацилл в диапазоне концентраций: лактата 2,9 \pm 0,39 мМ/л, пероксида водорода 2,1 \pm 0,3 мМ/л, сурфактантов 22 \pm 1,4 у.е. Помимо этого, в исследовании были использованы супернатанты лактобацилл, выделенных из пробиотического препарата Лактожиналь® (*L. casei rhamnosus* 35). О возможности влияния метаболитов лактобацилл на чувствительность микроорганизмов к метронидазолу судили по МПК анти-микробного препарата.

Для оценки влияния метаболитов лактобацилл на метаболизм БВ-ассоциированных микроорганизмов к бульонным культурам и биопленкам *G. vaginalis* добавляли клиндамицин и метаболиты лактобацилл, инкубировали в течение 24 ч анаэробно при 37 °С. В рамках исследования был использован клиндамицин и следующие конечные концентрации пероксида водорода: 2 мМ/л; лактата: 2,5 мМ/л; сурфактанта: 22 у.е. Эффективность уничтожения микроорганизмов в биопленках оценивали при помощи высева на Columbia Blood Agar Base (HiMedia, Индия) с добавлением стерильной дефибринированной крови барана (до 5 % об/об), культивировали при 37 °С в течение 48 часов в анаэробных условиях.

До и после обработки метаболитами лактобацилл бактерий и клиндамицином производилась регистрация значений АТФ в биопленке с помощью люциферин-люциферазной системы (набор BacTiter-Glo Promega, Madison, WI, США). Концентрацию АТФ выражали в мкмоль/мг белка (Chen F. Et al., 1994).

Эффективность совместного применения метронидазола и раствора, содержащего ионы двухвалентного железа, на эффективность элиминации *T. vaginalis in vitro*. В рамках исследования были использованы: растворы солей железа FeCl₂, FeSO₄, минеральная вода скважины №33 на территории санатория «Гай» Оренбургской области (бальнеологическое заключение РНЦВМиК №14/249 от 26.04.2000) и аналог минеральной воды без ионов двухвалентного железа. К двухсуточным культурам трихомонад вносили раствор метронидазола (для достижения конечных концентраций: 0 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 15 мкг/мл) и один из тестируемых растворов. Антипротозойную эффективность метронидазола оценивали в присутствии ионов двухвалентного железа в концентрациях: 3 мМ/л, 7,5 мМ/л, 15 мМ/л, в присутствии минеральной воды, содержащей ионы двухвалентного железа в концентрации 8,96 мМ/л и ее аналога, без ионов двухвалентного железа. Влияние ионов железа на чувствительность трихомонад к метронидазолу оценивали по МПК антимикробного препарата через 48 часов инкубации в термостате при температуре 37 °С. Оценку и подсчет количества подвижных форм *T. vaginalis* осуществляли при помощи камеры Горяева.

Эффективность совместного применения антимикробных и пробиотических препаратов у пациенток с бактериальным вагинозом и трихомониазом проводили при участии 40 женщин с диагнозом трихомониаз и бактериальный вагиноз, 6 - с диагнозом трихомониаз на фоне нормального количества лактобацилл. По результатам предварительного скрининга 40 участниц с подтвержденным диагнозом трихомониаз и бактериальный вагиноз были рандомизированы в две равные группы – «группа сравнения с БВ» и «группа исследования с БВ». 6 женщин с диагнозом трихомониаз на фоне нормального количества лактобацилл были сформированы в отдельную группу - «группа сравнения с нормальным количеством лактобацилл». Все пациентки из трёх групп (46 женщин) получали терапию препаратом метронидазол по схеме – 500 мг перорально, два раза в сутки, в течение 7 дней, согласно инструкции препарата. В дополнение к вышеописанному лечению пациентки из группы исследования с БВ (20 женщин) получали препарат Лактожиналь® интравагинально по 1 капсуле 2 раза в сутки, в течение 7 дней. Для получения данных об эффективности проведенной терапии всем пациенткам до начала лечения, на 4-й, 8-й и 22-й день проводили бактериологическое, микроскопическое исследование. Критериями эффективности применяемой терапии являлась частота

обнаружения *T. vaginalis*, изменение численности *A. vaginae*, *G. vaginalis*, условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) и *Lactobacillus spp.*

Эффективность лечения БВ с учетом влияния метаболитов лактобацилл на метаболизм БВ-ассоциированных микроорганизмов проводили при участии 30 женщин, страдающих рецидивирующим БВ. Исследование осуществлялось в несколько этапов. В рамках первого этапа оценивали эффективность сочетанного применения клиндамицина и одного из пробиотиков у женщин (Кубанова А. А. и др., 2016). Одновременно с этим в условиях *in vitro* оценивали способность метаболитов лактобацилл из пробиотических препаратов увеличивать продукцию АТФ у гарднерелл, выделенных от участниц исследования. Во втором этапе исследования продолжили участие пациентки, у которых в течение 3 месяцев после первого этапа исследования возник рецидив БВ и пациентки у которых не удалось излечить БВ (Рисунок 1).

Для этого до проведения терапии бактериального вагиноза от пациентки получали образец цервико-вагинального содержимого, из полученного образца выделяли культуры микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом.



Рисунок 1 – Дизайн исследования эффективности комбинированной терапии бактериального вагиноза в зависимости от способности лактобацилл пробиотика модулировать продукцию АТФ БВ-ассоциированными микроорганизмами

К выделенным культурам последовательно добавляли предварительно полученные метаболиты лактобацилл пробиотических препаратов

(Лактожиналь®), Лактонорм®, Экофемин®, Гинофлор®), и оценивали изменение уровня продукции АТФ БВ-ассоциированными микроорганизмами. На основании результатов, полученных в ходе оценки влияния метаболитов лактобацилл из пробиотических препаратов на продукцию АТФ у гарднерелл, выделенных от участниц исследования, производился выбор пробиотического препарата. Оптимальным пробиотическим препаратом считали препарат, содержащий лактобациллы, метаболиты которых приводили к максимальному увеличению продукции АТФ в биопленках гарднерелл. После того как был выбран оптимальный пробиотический препарат, приступали ко второму этапу исследования.

Эффективность применяемой терапии оценивали по клиническому и лабораторному выздоровлению через неделю после завершения терапии, и отсутствию рецидивов в течение следующих 3 месяцев наблюдения.

Исследование влияния совместного применения препаратов из группы 5-нитроимидазолов, их комбинаций и раствора, содержащего ионы двухвалентного железа на эффективность элиминации T. vaginalis проводилось при участии 224 женщин с трихомониазом, которые были разделены на десять групп. Дополнительно к этиотропному лечению пациентки из групп исследования получали интравагинальную терапию водным раствором, содержащим ионы железа, в течение 7 дней, путем орошения влагалища (с экспозицией не менее 10 мин). Пациенткам из групп сравнения осуществляли орошение влагалища физиологическим раствором (с экспозицией не менее 10 мин).

В качестве раствора, содержащего ионы переменной валентности, была использована минеральная вода скважины №33 на территории санатория «Гай» Оренбургской области, содержащая ионы двухвалентного железа и разрешенная для интравагинального применения (бальнеологическое заключение РНЦВМиК №14/249 от 26.04.2000).

Для получения данных об эффективности проведенной терапии всем пациенткам до начала лечения, на 4, 8 и на 22 день исследования проводили бактериологическое, микроскопическое исследование. Критерием эффективности применяемой терапии являлась частота обнаружения *T. vaginalis* при микроскопическом исследовании культуры, полученной из образца цервикагинальной жидкости (Рисунок 2).

Критерием эффективности применяемой терапии являлась частота обнаружения *T. vaginalis* при микроскопическом исследовании культуры, полученной из образца цервикагинальной жидкости.

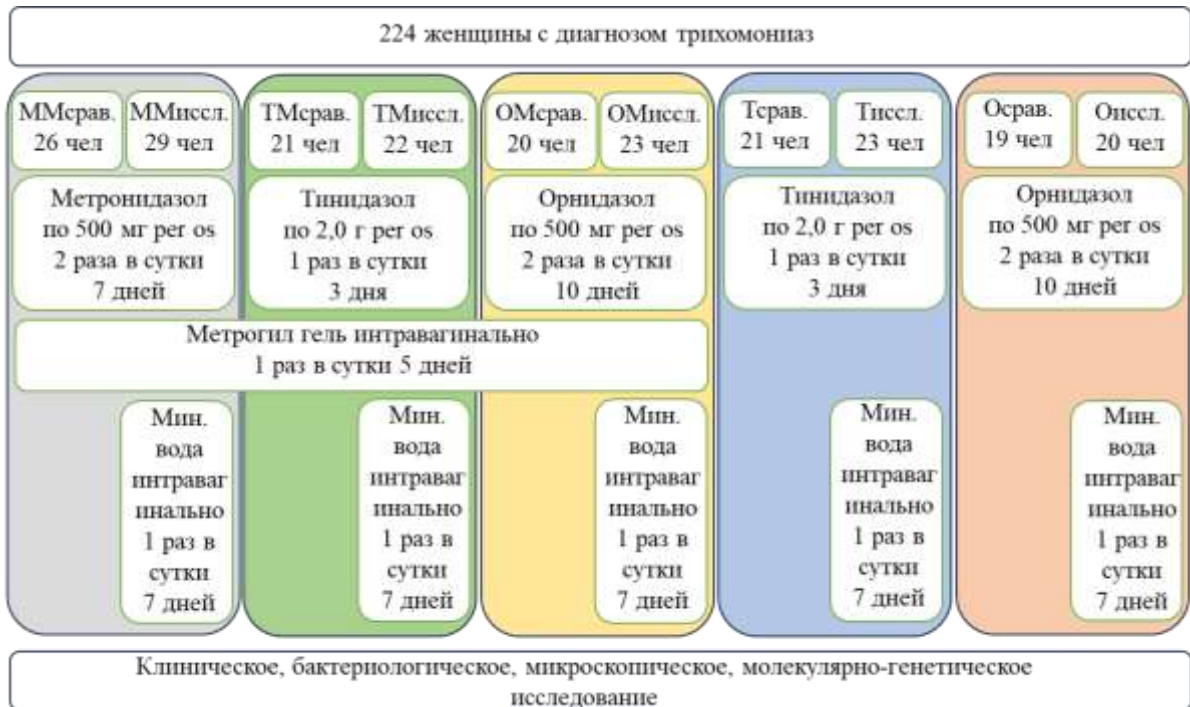


Рисунок 2 – Дизайн исследования влияния совместного применения препаратов из группы 5-нитроимидазолов, их комбинаций и раствора, содержащего ионы переходных металлов на эффективность элиминации *T. vaginalis* у женщин

Статистический анализ. Все исследования проводили в двух повторностях и в трехкратном воспроизведении. При статистической обработке полученных результатов проверка нормальности распределения данных проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых $n > 50$) или критерия Шапиро-Уилка (при $n < 50$). Количественные признаки представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (σ). Для оценки достоверности различий между группами исследования и группами сравнения в случае нормального распределения количественных данных использовали t -критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей, в других случаях непараметрический U -критерий Манна-Уитни. В случае альтернативных признаков определяли долю объектов в выборке, обладающих этим признаком. Доли различных выборок сравнивали друг с другом посредством критерия хи-квадрат Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса. Исследование взаимосвязи между признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена (r).

Результаты исследований

Для исследования влияния метаболитов лактобацилл на чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам *in vitro* были определены среднепопуляционные концентрации метаболитов, продуцируемые штаммами лактобацилл, выделенных от здоровых женщин фертильного возраста. Так средняя концентрация пероксида водорода, продуцируемого лактобациллами составила $2,1 \pm 0,3$ мМ/л, лактата $2,9 \pm 0,39$ мМ/л, сурфактантов $22 \pm 1,4$ у.е. В последующих исследованиях использовали метаболиты лактобацилл в концентрациях приблизительно равных средним концентрациям в популяции (Рисунок 3).

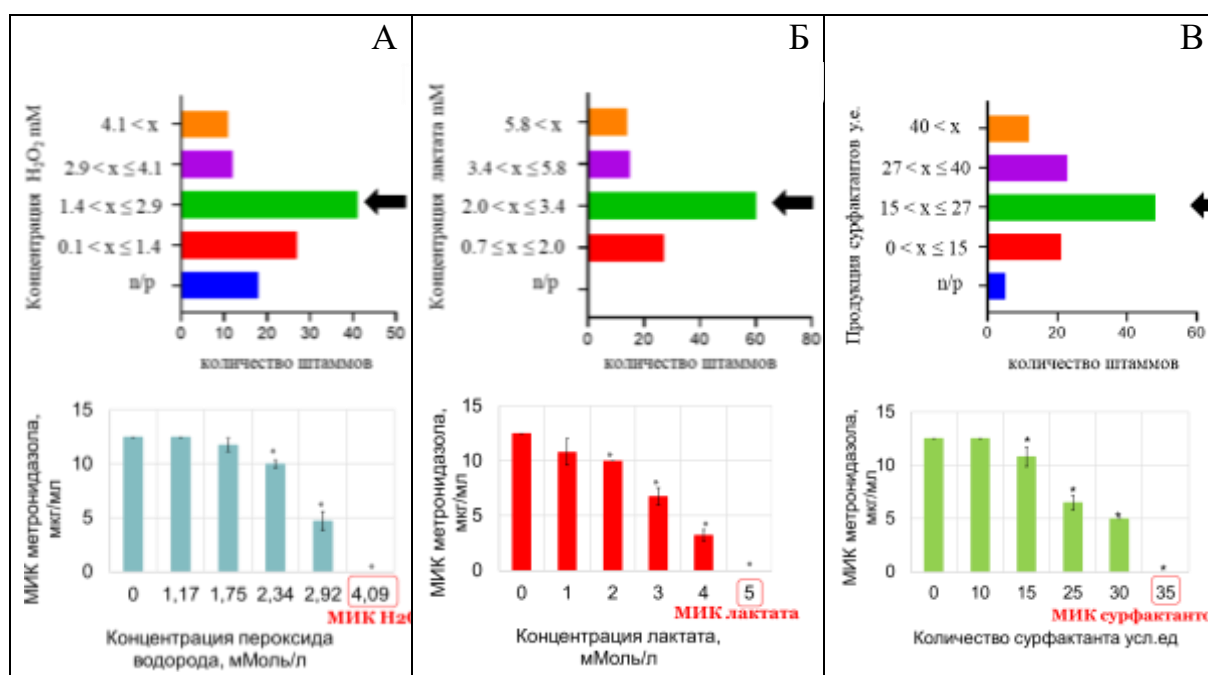


Рисунок 3 – Среднепопуляционные концентрации метаболитов лактобацилл и их влияние на чувствительность *T. vaginalis* к метронидазолу *in vitro*: пероксид водорода (А), лактат (Б), сурфактант (В) (* $p \leq 0.001$)

Оценка влияния метаболитов лактобацилл на чувствительность *T. vaginalis* к метронидазолу *in vitro* позволила установить, что применение метаболитов лактобацилл приводит к уменьшению МПК метронидазола в отношении *T. vaginalis* и снижению количества подвижных форм трихомонад (Рисунок 3).

При оценке влияния метаболитов лактобацилл на чувствительность культур *G. vaginalis* в биопленках к метронидазолу *in vitro* нами было установлено, метаболиты пробиотического штамма *Lcr35*, и отдельные их

компоненты увеличивают чувствительность гарднерелл в биопленках к метронидазолу и делают ее близкой к чувствительности планктонной культуры. В планктонных культурах минимальная подавляющая концентрация метронидазола была достоверно ниже на 85 %, чем в биопленках ($p < 0,05$). После воздействия лактата на биопленки было зарегистрировано снижение минимальной подавляющей концентрации метронидазола на 57 %, что свидетельствует об увеличении чувствительности гарднерелл в биопленках к антимикробному препарату ($p < 0,05$). Чувствительность *G. vaginalis* в биопленках к метронидазолу после обработок сурфактантами лактобацилл возрастала, это проявлялось уменьшением МПК метронидазола на 74 % ($p < 0,001$). Применение пероксида водорода позволило снизить МПК метронидазола на 85 % ($p < 0,001$). Кроме того, было установлено, что применение супернатантов штамма *Lcr35* приводило к повышению чувствительности гарднерелл в биопленках к метронидазолу, наблюдали снижение МПК антимикробного препарата на 76 % ($p < 0,001$) (Рисунок 4А).

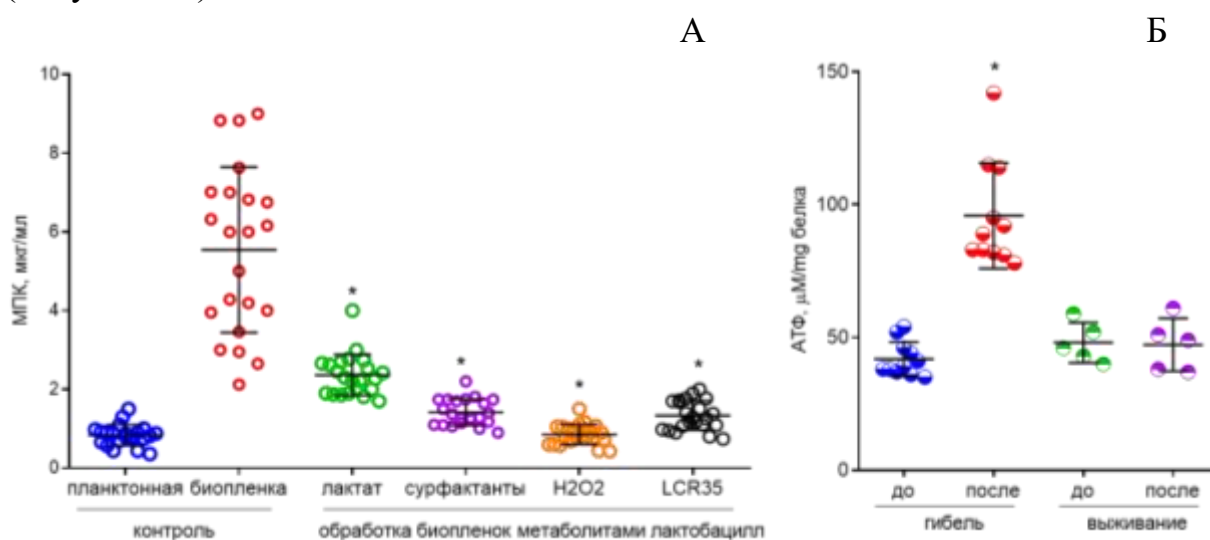


Рисунок 4 – Влияние метаболитов лактобацилл на чувствительность *G. vaginalis* к метронидазолу *in vitro* (А); взаимосвязь между изменением уровня продукции АТФ в биопленках *G. vaginalis* и чувствительностью гарднерелл к антимикробному препарату под влиянием метаболитов лактобацилл (Б) * $p \leq 0.001$

Дополнительно нами было отмечено, что в контролях, которые включали обработку гарднерелл только супернатантами клинических изолятов лактобацилл и штамма *Lcr35*, наблюдали увеличение количества восстановленного формазана, что свидетельствует о большей метаболической активности бактерий в биопленке в сравнении с другими контрольными пробами. Это натолкнуло нас на мысль о том, что лактобациллы и их метаболиты способны

повышать скорость метаболизма у бактерий в биопленках, что делает бактерии чувствительными к действию неблагоприятных факторов. Для доказательства данного предположения был проведен следующий этап исследования, в рамках которого определяли изменение уровня АТФ в сформированных биопленках под влиянием метаболитов пробиотических штаммов. Для этого биопленки 5-и штаммов гарднерелл обрабатывали клиндамицином и метаболитами 16-и штаммов лактобацилл, полученных от здоровых женщин. После чего оценивали изменения значений АТФ в биопленках гарднерелл и соотносили с эффективностью клиндамицина. Было установлено, что полное уничтожение микроорганизмов в биопленке наступает только в том случае, если совместно с антимикробными веществами применялись метаболиты лактобацилл, которые приводят к увеличению значений АТФ в биопленке в два и более раза по сравнению с исходным (Рисунок 4Б). Однако, в случае применения лактобацилл, которые не приводили к изменениям значений АТФ, чувствительность *G. vaginalis* к антимикробному препарату оставалась на прежнем уровне.

Изучение влияния изменений микрoэкологических факторов биотопa путем применения пробиотических препаратов на клиническую эффективность терапии трихомониаза на фоне бактериального вагиноза позволила установить, что чувствительность трихомонад к метронидазолу зависит от видового состава микрофлоры вагинального биотопa и доминирования тех или иных микроорганизмов. Так, в группе сравнения с БВ эффективность антипротозойного эффекта метронидазола была низкой, о чем свидетельствовала высокая (80 % пациенток) частота выделения трихомонад после лечения (Рисунок 5А). В то же время, в группе сравнения с нормальным количеством лактобацилл после применения метронидазола частота обнаружения трихомонад была значительно ниже, чем в группе сравнения с БВ и составила 22 % (Рисунок 5Б).

После совместного применения метронидазола и пробиотического препарата в группе исследования с БВ, частота случаев обнаружения трихомонад составила 10 % (Рисунок 5В), что значительно меньше показателей в группе сравнения с БВ (80 %) и группе сравнения с нормальным количеством лактобацилл (22 %) ($\chi^2=22,5$; $p<0,001$) (Рисунок 5). В обеих группах, где применялся только метронидазол, было отмечено уменьшение количества БВ-ассоциированных микроорганизмов.

Хочется отметить, что после применения метронидазола в группе исследования с БВ наблюдалось увеличение количества *Lactobacillus spp.* более чем в 1400 раз и все равно их количество не достигло даже исходных показателей в группе сравнения с нормальным количеством лактобацилл (Рисунок 5).

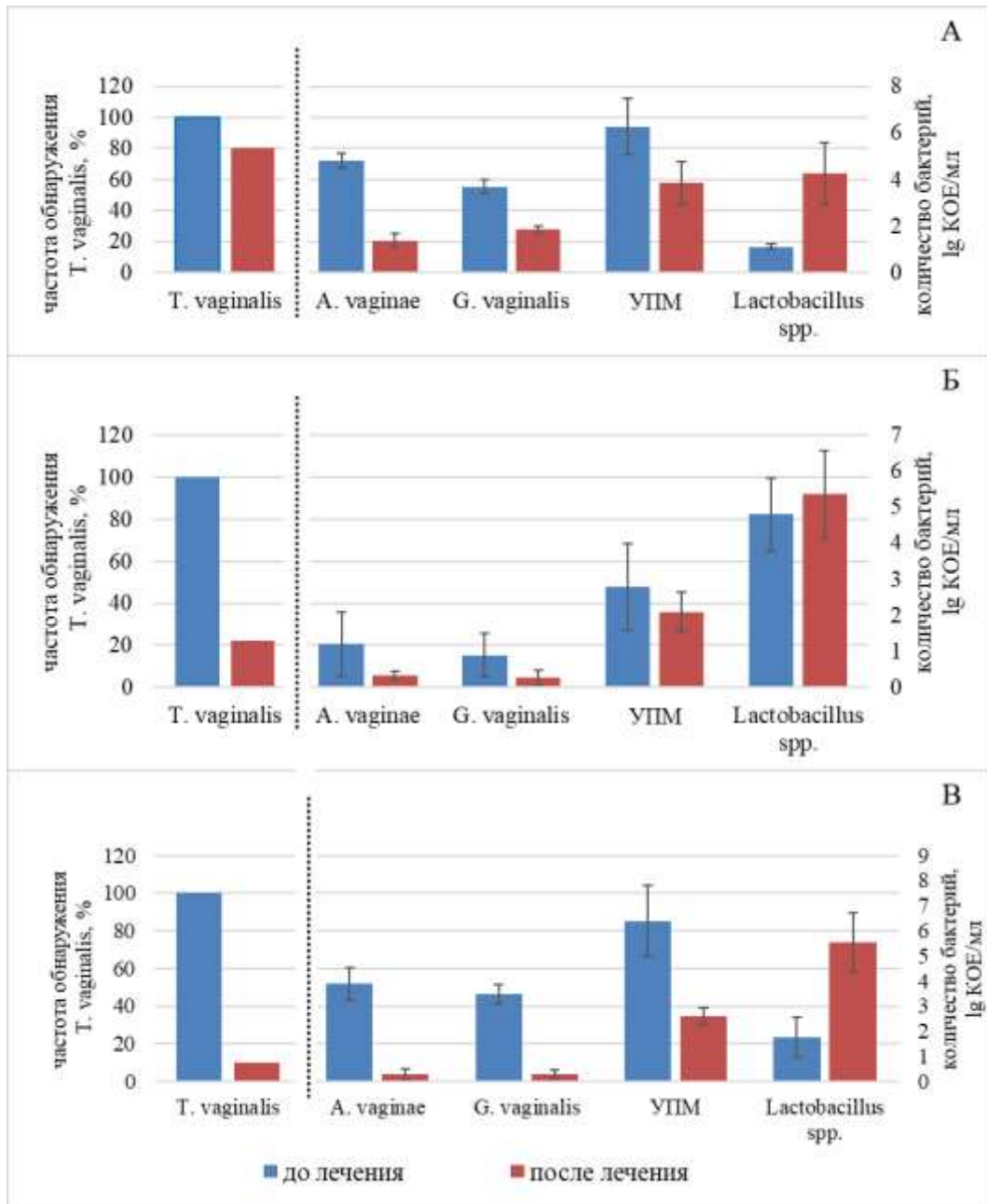


Рисунок 5 – Частота случаев обнаружения *T. vaginalis* и ПМО *A. vaginae*, *G. vaginalis*, YIPM, *Lactobacillus spp.* в процессе терапии трихомониаза с применением метронидазола в группе сравнения с БВ (А), в группе сравнения с нормальным количеством лактобацилл (Б), в группе исследования с БВ с дополнительным применением пробиотического препарата (В)

Отмечено более интенсивное смещение редокс-потенциала в окислительную область, снижение рН и нитратредуктазной активности в группе, где применяли пробиотик. Таким образом нормальный уровень лактобацилл в вагинальном биотопе или их интродукция в виде пробиотического препарата

обеспечивают более высокую эффективность элиминации возбудителя, чем в условиях дефицита лактобацилл.

Оценка эффективности комбинированной терапии бактериального вагиноза в зависимости от способности лактобацилл пробиотика модулировать продукцию АТФ БВ-ассоциированными микроорганизмами осуществлялась в два этапа. В результате первого этапа исследования было установлено, что полное клиническое и лабораторное выздоровление через неделю после завершения терапии наблюдалось у 24 из 30 пациенток, но в течение 3 месяцев наблюдения у 4 из 24 пациенток, был зарегистрирован рецидив БВ (Рисунок 6А). Эффективность лечения БВ с учетом рецидивов на первом этапе составила 70 %. Важно отметить взаимосвязь между излеченностью пациентки и увеличением продукции АТФ у штамма *G. vaginalis* в два и более раза под влиянием метаболитов пробиотика.

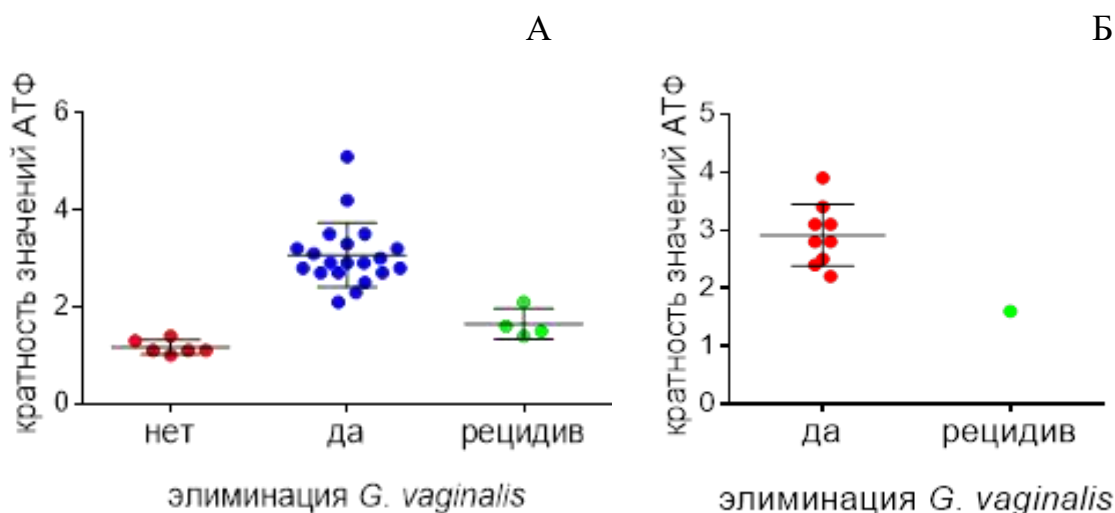


Рисунок 6 - Эффективность терапии БВ в зависимости от кратности изменений значений АТФ в биопленке под влиянием метаболитов лактобацилл случайно выбранного пробиотика (А) под влиянием метаболитов лактобацилл индивидуально подобранного пробиотика (Б) * $p \leq 0.001$

Во втором этапе исследования продолжили участие пациентки, у которых в течение 3 месяцев после первого этапа исследования возник рецидив БВ (9 женщин) и пациентка, у которой не удалось излечить БВ (1 женщина).

На основании результатов, полученных в ходе оценки влияния метаболитов лактобацилл из пробиотических препаратов на продукцию АТФ у гарднерелл, выделенных от участниц исследования, производился выбор пробиотического препарата, метаболиты которых приводили к максимальному

увеличению продукции АТФ в биопленках. После того как был выбран оптимальный пробиотический препарат, приступали ко второму этапу исследования. В результате исследования было установлено, что полное клиническое и лабораторное выздоровление наблюдалось у всех десяти пациенток, но в течение 3 месяцев у 1 пациентки возник рецидив БВ (Рисунок 6Б).

Эффективность лечения рецидивирующего БВ с учетом рецидивов на втором этапе составила 90 %. Важно отметить, что штаммы *G. vaginalis* всех излечившихся пациенток под влиянием лактобацилл увеличивали продукцию АТФ в два и более раза.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности совместного применения антимикробного препарата и индивидуально подобранного пробиотика в лечении бактериального вагиноза и легли в основу создания способа лечения бактериального вагиноза (положительное решение на выдачу патента по заявке на изобретение № 2022121049/14(044359).

Следующим этапом исследования была оценка эффективности совместного применения метронидазола и раствора, содержащего ионы переходных металлов на эффективность элиминации *T. vaginalis* у женщин. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности совместного применения антимикробного препарата и раствора, содержащего ионы железа. Учитывая, уже ко второму визиту на 4-й день от начала лечения частота обнаружения трихомонад в группе исследования составила 27,5 %, тогда как в группе сравнения 80,7 % ($p \leq 0.01$) (Рисунок 7).

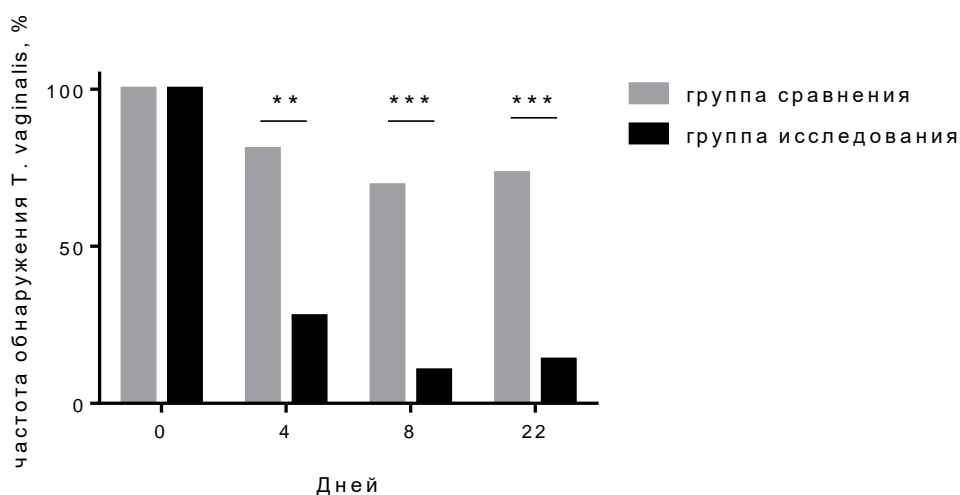


Рисунок 7 – Частота обнаружения *T. vaginalis* в группе исследования и группе сравнения

** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$

К завершению терапии, на 8-й день, трихомонады были выявлены лишь у 10,3 % пациенток группы исследования и у 69,2 % пациенток группы сравнения ($p \leq 0.001$). На 22-й день исследования в обеих группах было зарегистрировано по одному новому случаю трихомонадной инфекции. Так, частота обнаружения трихомонад в группе исследования составила 13,7 %, тогда как в группе сравнения 73 % ($p \leq 0.001$). Кроме того, было произведено исследование влияния совместного применения других препаратов из группы 5-нитроимидазолов (орнидазол, тинидазол), их комбинаций и минеральной воды на эффективность элиминации трихомонад. В результате проведенных исследований было установлено, что применение минеральной воды, содержащей ионы железа Fe^{2+} в концентрации 8,96 мМ/л и более, позволяет потенцировать антипротозойное действие не только метронидазола, но и его аналогов (орнидазол, тинидазол). Полученные данные легли в основу создания способа лечения трихомонадной инфекции, на который был получен патент на изобретение № 2726123 «Способ лечения трихомониаза у женщин» от 20 декабря 2019 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов формирования патоценозов, их устойчивости или чувствительности к неблагоприятным факторам актуально для решения микробиологических и медицинских проблем. Нами были исследованы факторы, определяющие устойчивость или чувствительность патоценоза урогенитального тракта женщин «*T. vaginalis* / БВ-ассоциированные микроорганизмы» к антимикробным препаратам. В результате исследования мы выявили, что устойчивость патогена к антимикробному препарату определяется типом биоценоза, так чем ближе микрoэкологические параметры биоценоза к нормоценозу, тем более чувствителен патоген к антимикробному препарату. Нами было установлено, что устойчивостью патоценоза можно управлять, изменяя его как микробиологические, так и физико-химические параметры.

ВЫВОДЫ

1) Применение метаболитов лактобацилл, приводит к снижению МПК антимикробных препаратов *in vitro* в отношении планктонных культур *T. vaginalis* и *G. vaginalis*, а также в отношении биопленок *G. vaginalis*.

2) Установлена прямая зависимость между увеличением значений АТФ в биопленках БВ-ассоциированных микроорганизмов и выраженностью антимикробного эффекта антибиотика *in vitro*.

3) Эффективность элиминации *T. vaginalis* у женщин напрямую зависит от количественных характеристик нормобиоты. Нормальный уровень

лактобацилл в вагинальном биотопе или их применение в виде пробиотического препарата обеспечивает более высокую эффективность элиминации возбудителя, чем в условиях дефицита лактобацилл.

4) Сочетанное применение антибиотика и индивидуально подобранного пробиотического штамма, метаболиты которого увеличивают продукцию АТФ БВ-ассоциированными микроорганизмам в два и более раза, определяет эффективность терапии БВ и значительно снижает риски рецидива.

5) Доступность ионов двухвалентного железа для *T. vaginalis* определяет эффективность терапии трихомониаза препаратами из группы 5-нитроимидазолов, что снижает риск хронического течения инфекции и осложнений.

Практические рекомендации

1. Лечение урогенитального трихомониаза у женщин согласно способу, описанному в патенте РФ на изобретение: №2726123 от 09.07.2020 Бюллетень №19 «Способ лечения трихомониаза у женщин».

2. Лечение бактериального вагиноза у женщин согласно способу, описанному в заявке на патент РФ на изобретение: № 2022121049/14(044359) от 02.08.2023 «Способ лечения бактериального вагиноза» (получено положительное решение о выдаче патента по заявке на изобретение на изобретение).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшее продолжение работ по тематике исследования планируется проводить с целью установления молекулярных механизмов участия нормальной и патологической микробиоты в обеспечении эффективной защиты вагинального биотопа. В частности, планируется изучение влияния неспецифических факторов защиты хозяина и метаболитов нормальной микрофлоры на экспрессию патогенами фенотипических и генотипических признаков, обеспечивающих устойчивость к антимикробным веществам различного происхождения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Совместное применение антимикробных и пробиотических препаратов как способ повышения эффективности терапии генитальных инфекций / А.В. Сгибнев, Е.А. Кремлева, Ю.С. Щетинина, Ю.И. Черкасова. - Текст: непосредственный // *Акушерство и гинекология.* - 2018. - № 4. - С. 113-118. [Scopus Q3, RSCI]

2. Черкасова, Ю.И. Влияние местного применения раствора, содержащего ионы железа двухвалентного, на эффективность терапии рецидивирующего урогенитального трихомониаза у женщин / Ю.И. Черкасова, Е.А. Кремлева, Ю.С. Щетинина, А.В. Сгибнев. Текст: непосредственный // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* - 2022. - Т. 24. - №. 1. - С. 77-82. [ВАК К1, Scopus Q4, RSCI]

3. Черкасова, Ю.И. Современные представления о возбудителе урогенитального трихомониаза / Ю.И. Черкасова, Ю.Л. Мячина, Д.А. Крайникова. - Текст: электронный // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* - 2022. - № 3. - С. 22. - URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-3/Articles/CYI-2022-3.pdf> (дата обращения: 05.06.2023)

Патент РФ

4. Патент №2726123 Российская Федерация, МПК А61К 31/41(2006.01), А61К 33/26(2006.01), А61Р 15/00(2006.01), А61Р 15/02(2006.01), Способ лечения трихомониаза у женщин: № 2019143544: заявл. 20.12.2019: опубликовано 09.07.2020 / Черкасова Ю.И., Кремлева Е.А., Щетинина Ю.С., Сгибнев А.В.; заявитель ФГБУН ОФИЦ УРО РАН. 7 с. : ил. - Текст: непосредственный.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Lcr35 – *Lactobacillus casei rhamnosus 35*

БВ – бактериальный вагиноз

АТФ – аденозинтрифосфат

МПК – минимальная подавляющая концентрация

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

ТМсрав. – группа сравнения, где использовали тинидазол и Метрогил® гель

ТМиссл. – группа исследования, где использовали тинидазол, Метрогил® гель и минеральную воду

ОМсрав. – группа сравнения, где использовали орнидазол и Метрогил® гель

ОМиссл. – группа исследования, где использовали орнидазол, Метрогил® гель и минеральную воду

Тсрав. – группа сравнения, где использовали тинидазол

Тиссл. – группа исследования, где использовали тинидазол и минеральную воду

Осрав. – группа сравнения, где использовали орнидазол

Оиссл. – группа исследования, где использовали орнидазол и минеральную воду