

На правах рукописи

ЦЫПУРДЕЕВА

Наталья Дмитриевна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА
У ПАЦИЕНТОК С НЕЭФФЕКТИВНЫМИ ПРОТОКОЛАМИ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ В АНАМНЕЗЕ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"

Научные руководители:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
з.д.н. РФ, доктор медицинских наук,
профессор

Коган Игорь Юрьевич

Савичева Алевтина Михайловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, ведущий
научный сотрудник отделения
вспомогательных технологий в лечении
бесплодия имени профессора Б.В. Леонова
ФГБУ "Национальный медицинский
исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии
им. В.И. Кулакова"

Смольникова Вероника Юрьевна

доктор медицинских наук,
заместитель главного врача по акушерству,
гинекологии и репродуктивной
медицине ООО "Ава-Петер"

Калугина Алла Станиславовна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования "Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова" Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится "____" _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.021.01 при ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" (199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, дом 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" и на сайте <http://ott.ru/all-news/dissert/zawita-dissertacii-cypurdeeva-nataliya-dmitrievna/>

Автореферат разослан "____" _____ 2018 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**
доктор медицинских наук

Кузьминых Татьяна Ульяновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Нарушение морфофункциональных свойств эндометрия является важной детерминантой бесплодия, невынашивания беременности, неэффективных протоколов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Одной из причин изменения рецептивных свойств эндометрия являются воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), в том числе хронический эндометрит (ХЭ) (Savaris R.F. et al., 2006; Daftary A. et al., 2007; Pietro C. et al., 2014). К настоящему времени имеется большое количество зарубежных и отечественных исследований, посвящённых этиологии, диагностике, лечению данной патологии. Однако консенсусных решений по вышеперечисленным вопросам не получено, и сегодня трудно найти иную гинекологическую патологию, которая была бы основой для столь частых и острых научно-практических дискуссий. Одним из поводов для подобных дискуссий является определение роли микроорганизмов, выявленных в эндометрии, в генезе хронического воспаления и ассоциированной с ним инфертильности. Эта проблема находится в контенте общей теории хронического воспаления и его последствий для функциональной репродуктивной системы. Еще на рубеже веков Viniker D.A. (1999) и Romero R. et al. (2004) для определения роли микроорганизмов эндометрия в генезе нарушений имплантации эмбриона использовали гипотезу "субклинической эндометриальной инфекции". В рамках изучения роли микробиома человека в репродукции, в последующих исследованиях были получены данные о его составе в эндометрии: после гистерэктомии (Mitchell C.M. et al., 2015), у пациенток с ВЗОМТ (Cicinelli E. et al., 2008; Haggerty C.L. et al., 2014, 2016), бесплодием (Polisseni F. et al., 2004), повторными неудачами имплантации (Cicinelli E. et al., 2015), неразвивающимися беременностями (Краснопольский В.И. и соавт., 2004), а также у условно здоровых пациенток (Cicinelli E. et al., 2008, 2009, 2014; Horner P. et al., 2014). При этом для микробиологического исследования были использованы разные методы получения клинического материала (операционный материал, соскоб из полости матки кюреткой, пайпель-биопсия эндометрия), применение части из которых не исключает контаминацию

материала содержимым влагалища и цервикального канала, а также разные методы анализа (культуральный, молекулярно-биологический, в том числе полимеразная цепная реакция и флуоресцентная гибридизация *in situ*).

Полученные данные явились основой формирования новой парадигмы предгравидарной стратегии, и это касается, прежде всего, эмпирической антибиотикотерапии при ВЗОМТ и хроническом эндометрите (Cicinelli E. et al., 2015). Однако до настоящего времени остаётся непонятным, оказывают ли выявленные в эндометрии микроорганизмы негативное влияние на имплантацию или они обладают качествами комменсальных. Не изучена взаимосвязь между степенью морфологических изменений эндометрия и его таксономическим профилем, а также формирование и состав возможных микробных ассоциаций при данной патологии. Остаются неоднозначными данные об эффективности эмпирического подхода в применении антибиотиков в реализации репродуктивной функции у пациенток с инфертильностью, а также факторы, влияющие на результат лечения (Brook N. et al., 2006; Kroon B. et al., 2012; Cicinelli E. et al., 2015).

Цель исследования: разработка способа повышения эффективности преодоления бесплодия у пациенток с хроническим эндометритом и неудачными протоколами ЭКО в анамнезе с учетом оценки особенностей микробиоты эндометрия.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности акушерско-гинекологического анамнеза у пациенток с неэффективными протоколами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе.
2. Сравнить таксономический профиль микробиоты эндометрия при хроническом эндометрите разной степени активности и без хронического эндометрита.
3. Определить взаимосвязь между показателями акушерско-гинекологического анамнеза, составом микробиоты эндометрия и активностью локальных иммунопатологических реакций в эндометрии.
4. Определить эффективность применения антибактериальной терапии и иммуноглобулинов для внутривенного введения в прекоцепционный периоде у

пациенток с хроническим эндометритом и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе.

5. Выявить факторы, оказывающие влияние на эффективность терапии хронического эндометрита.

Научная новизна исследования. На основании комплексного полиметодического подхода были изучены особенности таксономического состава микробиоты эндометрия у пациенток с хроническим эндометритом и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе. Показано, что изменение состава микробиоты эндометрия, его дисфункция и реализация репродуктивной функции объединены причинно-следственными отношениями. Установлено, что преобладающей микрофлорой полости матки у женщин без хронического эндометрита являются *Lactobacillus* spp. и *Eubacterium* spp. При этом развитие хронического воспаления ассоциировано с увеличением частоты детекции *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Определена структура взаимосвязей между микроорганизмами в эндометрии у пациенток с отсутствием морфологических признаков хронического воспаления, а также с хроническим эндометритом разной степени активности. Доказана взаимосвязь между составом микробиоты эндометрия, выраженностью иммунопатологических реакций в эндометрии и показателями акушерско-гинекологического анамнеза, в том числе с внутриматочными вмешательствами. Выявлено, что применение в прекоцепционном периоде у пациенток с хроническим эндометритом антибактериальной терапии или иммуноглобулинов для внутривенного введения повышает частоту наступления беременности и родов. Показано, что преобладание в составе микробиоты эндометрия *Streptococcus* spp. оказывает негативное влияние на исход данной терапии.

Практическое значение исследования. Разработана модифицированная методика получения биоптата эндометрия с использованием в цервикальном канале проводника из поливинилхлоридного материала диаметром 3 мм, что снижает риск контаминации клинического материала из полости матки микроорганизмами нижних отделов репродуктивного тракта. Определено, что полимеразная цепная реакция, лежащая в основе теста Фемофлор, является

информативной методикой микробиологического изучения микробиоты эндометрия. Предложены два сопоставимых по эффективности метода лечения хронического эндометрита у пациенток с неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе в прекоцепционный период – антибактериальная терапия с использованием двух антибиотиков широкого спектра действия и применение иммуноглобулинов для внутривенной инфузии. Разработан прогностический показатель наступления беременности у пациенток с хроническим эндометритом и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе, основанный на оценке морфологического исследования эндометрия, его микробиоты и варианта терапии в прекоцепционном периоде.

Положения, выносимые на защиту:

1. Пациентки с бесплодием и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе имеют высокую частоту внутриматочных вмешательств, хронического эндометрита, невынашивания беременности; у половины из них при хроническом эндометрите имеют место различные варианты нарушения менструальной функции, а эндометрий визуально характеризуется неравномерной толщиной, усилением сосудистого рисунка.

2. Качественный состав микробиоты эндометрия у пациенток с неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе зависит от показателей акушерско-гинекологического анамнеза и степени морфофункциональной трансформации эндометрия, и при его хроническом воспалении характеризуется снижением частоты выявления количества *Lactobacillus* spp. и увеличением соответствующих показателей для *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., а также бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

3. Применение в прекоцепционном периоде у пациенток с хроническим эндометритом и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе антибактериальной терапии, в том числе сочетанной с иммуноглобулинами для внутривенной инфузии повышает эффективность преодоления бесплодия.

Внедрение результатов исследования в практику. Разработанные методы обследования и лечения внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), научно-

консультативного отделения, гинекологического отделения с операционным блоком, лаборатории микробиологии ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта".

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на 8-м Международном научном конгрессе "Оперативная гинекология – новые технологии", Санкт-Петербург, 2016; 17-м Всемирном конгрессе по репродукции человека", Италия, Рим, 2017; IV Национальном Конгрессе "Дискуссионные вопросы современного акушерства", Санкт-Петербург, 2017; Научно-практической конференции "Репродуктивная медицина XXI века. Взгляд экспертов", Москва, 2018.

Публикации. По результатам исследования опубликовано 5 научных работы, из них 3 – в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Личное участие автора. Автором самостоятельно проводился набор материала по теме диссертации, обследование и лечение пациенток, проведен анализ медицинской документации, выполнена систематизация и компьютерная обработка полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста и содержит: введение, обзор литературы, организацию, материалы и методы исследования, клиническую характеристику групп обследованных пациентов, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации.

Библиографический указатель включает 54 отечественных и 105 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 21 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Организация и материалы исследования

Настоящая работа проводилась на базе отделения ВРТ (руководитель отделения – д.м.н. Гзгзян А.М.), отделения гинекологии с операционным блоком (руководитель отделения – д.м.н. Попов Э.Н.) и лаборатории микробиологии (зав. лабораторией проф. – Савичева А.М.) ФГБНУ "Научно-

исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта". Исследование было проспективным (когортным, продольным) и носило сравнительный характер.

Критериями включения в исследование являлись: возраст женщин от 20 до 43 лет, ≥ 1 попытка ЭКО с переносом эмбрионов хорошего качества в анамнезе, отсутствие антибактериальной терапии в течение 6 месяцев до включения в исследование.

Критериями исключения были: ИМТ > 35 кг/м², миома матки (диаметр более 3 см и/или деформирующая полость), аденомиоз, гиперплазия эндометрия, азооспермия у партнера.

В соответствии с критериями включения и исключения были отобраны 107 пациенток. В зависимости от выраженности морфологических изменений в эндометрии пациентки были разделены на следующие 3 группы сравнения. Группу I составили пациентки, не имеющие признаков ХЭ (n=14), группу II – пациентки, имеющие признаки слабо выраженного ХЭ (n=20), группу III – пациентки с ХЭ умеренной и выраженной степени тяжести (n=73). Основой выделения групп пациенток явилась классификация степени выраженности хронического эндометрита путем подсчета иммунокомпетентных клеток при иммуногистохимическом исследовании, разработанная в НИИ АГиР им. Д.О. Отта (Толибова Г.Х. и соавт., 2015).

Всем пациентам проводилось обследование в соответствии с приказом Минздрава России №107н. В стационарных условиях проводилась диагностическая гистероскопия и биопсия эндометрия во вторую фазу менструального цикла (18-23 день). Получение клинического материала для последующего микробиологического (ПЦР в режиме реального времени) и морфологического (гистологического, иммуногистохимического) исследования осуществлялось модифицированным нами методом, который включал следующие этапы: 1 этап – двукратная обработка влагалища и влагалищной части шейки матки антисептическим раствором; 2 этап – для исключения контаминации биоптата эндометрия микрофлорой влагалища и цервикального канала, в последний под визуальным контролем до внутреннего зева вводили стерильный

прозрачный проводник из поливинилхлоридного материала диаметром 3 мм; 3 этап – через проводник атрауматической аспирационной кюреткой "Pipelle de Cornier" (Франция) получали клинический материал из полости матки.

Для исследования микрофлоры методом ПЦР в реальном времени использовали набор реагентов Фемофлор-16 (ООО "НПО ДНК-Технология", Москва).

Пациенткам (n=93) с ХЭ было проведено лечение не ранее, чем за 1 месяц до планирования беременности с использованием методов ВРТ (стимуляция суперовуляции в цикле ЭКО или заместительная гормональная терапия в криопротоколе).

Эмпирическую антибактериальную терапию в составе комбинации двух препаратов: макролид (джозамицин 500 мг 3 раза/день) и цефалоспорины III поколения (цефиксим 400 мг 1 раз/день) в течение 14 дней (согласно стандартам Европейской ассоциации по лечению ВЗОМТ 2012 г) получали 46 пациенток. Комбинированное лечение, предусматривающее антибактериальную терапию и использование внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) ("Иммуновенин" производства Микроген НПО, Россия) 100 мл (5 г) внутривенно капельно за 24 ч до переноса эмбрионов и 100 мл (5 г) через 7 дней после переноса эмбрионов получали 29 пациенток. Суммарная доза составила 10 г – 200 мл. 18 пациенток с ХЭ лечения не получали.

Эффективность проведённой терапии оценивалась по следующим показателям: частоте биохимической, клинической беременности, частоте родов, а также частоте самопроизвольных аборт и неразвивающихся беременностей.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica 10.; описательной статистики программы Excel 2010). Для сопоставления двух малых выборок по частоте встречаемости интересующего нас значения, применяли критерий Фишера (угловое преобразование Фишера), критический уровень достоверности нулевой

статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05 ($p \leq 0,05$). Сравнение количественных параметров в исследуемых группах осуществлялось с использованием критериев Mann-Whitney, медианного хи-квадрат и модуля ANOVA (Юнкеров В.И., Реброва О.В.). Корреляционный анализ проводился на основании коэффициент корреляции (r) Спирмена. Для дискриминации образцов в группах использовался многофакторный анализ (бинарная логистическая регрессия), который позволил вычислить вероятность "классификации в группу риска" (P) для каждого клинического образца. С целью определения структуры взаимосвязи между микроорганизмами в эндометрии в разных группах пациенток был проведен факторный анализ (вариант многомерного разведывательного анализа). Выделяли факторы, совокупная дисперсия которых превышала 50%, при этом в качестве основных факторов в каждой группе рассматривали факторы с максимальной долей общей дисперсии в выборке. Для создания интерпретируемой модели факторного пространства использовали ортогональное вращение по методу варимакс (вращение, максимизирующее дисперсию) с нормализованными данными. Высокой факторной нагрузкой переменной (корреляционной связью между переменной и фактором) считали значения выше 0,6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-анамнестические показатели групп обследованных пациенток

Пациентки I, II и III групп были сопоставимы по возрасту ($32,1 \pm 1,2$, $34,2 \pm 1,0$, $34,1 \pm 0,6$ года), частоте первичного (57,1%, 45%, 53,4%) и вторичного бесплодия (42,9%, 55%, 46,6%), частоте беременностей в анамнезе (42,8%, 55%, 46,6%), в том числе внематочных (14,3%, 10%, 8,2%), а также частоте родов (14,3%, 10%, 8,2%), оперативных вмешательств на органах малого таза (57,1%, 55%, 73,9%), гистероскопий (78,4%, 70%, 79,5%). Пациентки обследованных групп не различались также по частоте спаечной болезни органов малого таза и перенесённых в анамнезе урогенитальных инфекций (хламидийной, ассоциированной с *Ureaplasma* spp. и *M. hominis/genitalium*).

У пациенток II группы (с признаками слабо выраженного хронического эндометрита), по сравнению с III группой, имела место достоверно большая частота неразвивающихся беременностей (35% и 9,6%, $p=0,01$), искусственных аборт (35% и 13,7%, $p=0,04$), самопроизвольных выкидышей (65% и 16,4%, $p=0,0001$) и неэффективных протоколов ЭКО (≥ 3) в анамнезе (40% и 16,4%, $p=0,02$). У пациенток II группы, по сравнению с I группой, была выше также частота самопроизвольных выкидышей (65% и 14,3%, $p=0,004$) и выскабливаний полости матки (45% и 14,3%, $p=0,06$). Полученные данные могут быть обусловлены более частым использованием у пациенток II группы курсов антибактериальной терапии в связи с внутриматочными вмешательствами и влиянием последней на выраженность морфологической трансформации эндометрия.

Частота нарушения менструального цикла по типу дисменореи была достоверно выше у пациенток III группы (с выраженным хроническим эндометритом) по сравнению с I и II группами (38,4%, 0% и 10%, соответственно, $p<0,01$). Частота других типов нарушения менструального цикла не имела достоверного отличия.

В III группе больных достоверно чаще, по сравнению с пациентками II группы, был диагностирован наружный генитальный эндометриоз (42,5% и 20%, соответственно, $p=0,05$). Полученные данные могут свидетельствовать об общности механизмов повреждения эндометрия при хроническом эндометрите и генитальном эндометриозе, опосредованных провоспалительной реакцией. Об этом свидетельствуют также результаты некоторых зарубежных исследований (Takebayashi A. et al., 2014; Vercellini P. et al., 2014; Tortorella C. et al., 2014; Cicinelli E. et al., 2017).

Оценка основных визуальных характеристик эндометрия у пациенток обследованных групп, выявленных при гистероскопии

Визуальные изменения эндометрия определялись в I, II, и III группах в 28,6%, 55% и 56,2% случаев, соответственно (различия статистически не достоверны). Определено, что наиболее характерными гистероскопическими признаками хронического эндометрита являются: «неоднородность»

эндометрия (неравномерная толщина) и усиление сосудистого рисунка. Неравномерная толщина эндометрия определялась у большинства пациенток II и III групп (90,9% и 80,5%) и у каждой четвертой пациентки в I группе. Усиление сосудистого рисунка имело место у всех пациенток II группы и у каждой второй пациентки III группы (рисунок 1).

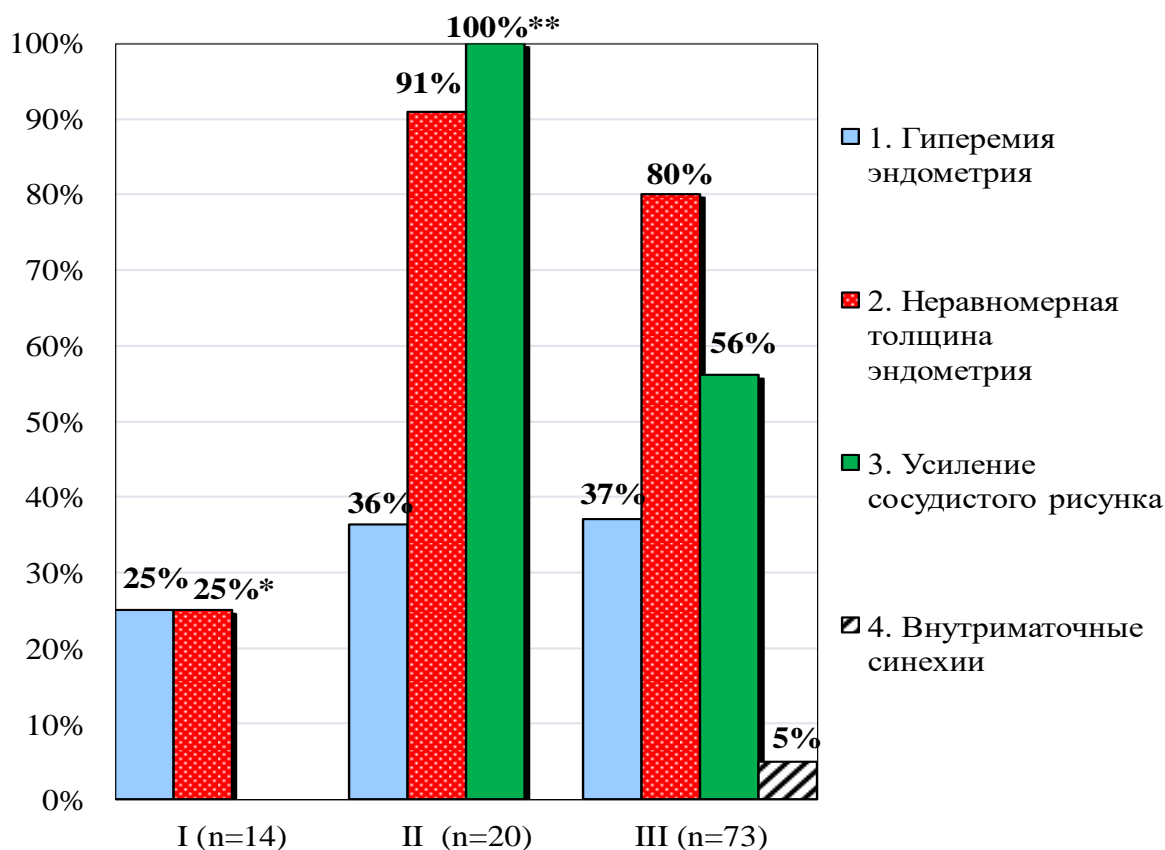


Рисунок 1 – Визуальные изменения эндометрия, выявленные при проведении гистероскопии у пациенток обследуемых групп
 * – $p=0,03$ по сравнению с II группой; $p=0,04$ по сравнению с III группой;
 ** – $p=0,0007$ по сравнению с I группой; $p=0,005$ по сравнению с III группой.

Основой подобной картины поверхности эндометрия являются изменения его морфофункциональных характеристик, в том числе нарушений микроциркуляции и активности пролиферативных и склеротических процессов.

Особенности гистологического строения эндометрия у пациенток обследованных групп

Несоответствие гистологического строения эндометрия дню менструального цикла у пациенток без ХЭ (I группа) наблюдалось в 57,2% случаев, с признаками слабо выраженного ХЭ (II группа) – в 40% случаев, с умеренно и выраженными признаками ХЭ (III группа) – в 63% случаях

(различия статистически не достоверны). При оценке гистологических признаков воспалительных изменений эндометрия отмечена большая частота выявления отека стромы эндометрия у пациенток II и III групп по сравнению с I группой, однако различия не были статистически достоверными (30% и 23,3%, 14,4%, соответственно, $p>0,05$). У пациенток III группы частота мононуклеарной инфильтрации была значимо выше по сравнению со II группой (34,2% и 10%, $p=0,03$). Таким образом, характерным морфологическим признаком выраженного хронического эндометрита по результатам нашего исследования, является мононуклеарная инфильтрация стромы эндометрия.

Оценка микробиоты эндометрия у пациенток обследованных групп

Результаты микробиологического исследования были положительными в 100% случаев, что согласуется с результатами зарубежных исследований (Swidsinski A. et al., 2013; Hillier S.L. et al., 2013; Cicinelli E. et al., 2015).

В микробиоте эндометрия у пациенток I группы (без морфологических признаков хронического воспаления) достоверно чаще, по сравнению с II и III группами, были представлены *Lactobacillus* spp. и *Eubacterium* spp. (таблица 1). Вероятно, лактобациллы, являясь представителями нормальной вагинальной микрофлоры, могут контаминировать полость матки, не вызывая развития воспалительного процесса и препятствуя колонизации условно-патогенной флоры (Moreno I. et al., 2016). При этом оптимальные для колонизации лактобацилл биохимические изменения эндометрия характерны для второй фазы менструального цикла, когда происходит выработка клетками эпителия железистых крипт протеинов, гликопротеидов, мукополисахаридов, липидов, а также выделение гликогена, который является необходимым субстратом для процесса имплантации бластоцисты (Хмельницкий О.К., 1994).

При слабо выраженном ХЭ (II группа) по сравнению с I группой микробиота эндометрия характеризовалась увеличением частоты детекции стрептококков (в 8 раз), стафилококков и энтеробактерий (в 1,5 раза) (таблица 1).

При умеренно и выраженном ХЭ (III группа) по сравнению с I группой в 1,5 раза чаще определялись стрептококки, стафилококки и энтеробактерии (таблица 1).

Таблица 1 – Частота выявления микроорганизмов в эндометрии методом ПЦР в режиме реального времени у пациенток обследуемых групп

Группа	Микроорганизм	Абс.(%)
I n=14	<i>Lactobacillus</i> spp.	12 (85,7%)*
	<i>Eubacterium</i> spp.	11 (78,6%)**
	<i>Staphylococcus</i> spp.	7 (50%)
II n=20	<i>Staphylococcus</i> spp.	16 (80%)
	<i>Streptococcus</i> spp.	11 (55%) ^α
	<i>Lactobacillus</i> spp.	10 (50%)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 (50%)
III n=73	<i>Staphylococcus</i> spp.	49 (67,1%)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	47 (64,4%) ^β
	<i>Streptococcus</i> spp.	41 (56,2%) ^{ββ}

Примечание: * – p=0,03 по сравнению с группой II, p=0,006 по сравнению с группой III;
 ** – p=0,002 по сравнению с группой II, p=0,003 по сравнению с группой III;
 α – p=0,004 по сравнению с группой I;
 β – p=0,04 по сравнению с группой I;
 ββ – p=0,006 по сравнению с группой I

В данном исследовании мы не выявили связи между хроническим эндометритом и большинством ассоциированных с бактериальным вагинозом бактерий (*Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas* spp., *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp., *Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp.).

Результаты факторного анализа ассоциаций микроорганизмов, выявляемых в эндометрии у пациенток обследованных групп

С целью определения структуры взаимосвязи между выявляемыми в эндометрии микроорганизмами был проведен факторный анализ.

У пациенток без морфологических признаков хронического эндометрита (I группа) была выявлена устойчивая взаимосвязь микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом: *Megasphaera* spp.+*Veillonella* spp.+*Dialister* spp., *A. vaginae*, *Gardnerella vaginalis*+*Prevotella bivia*+*Porphyromonas* spp., *Mobiluncus* spp.+*Corynebacterium* spp. (рисунок 2).

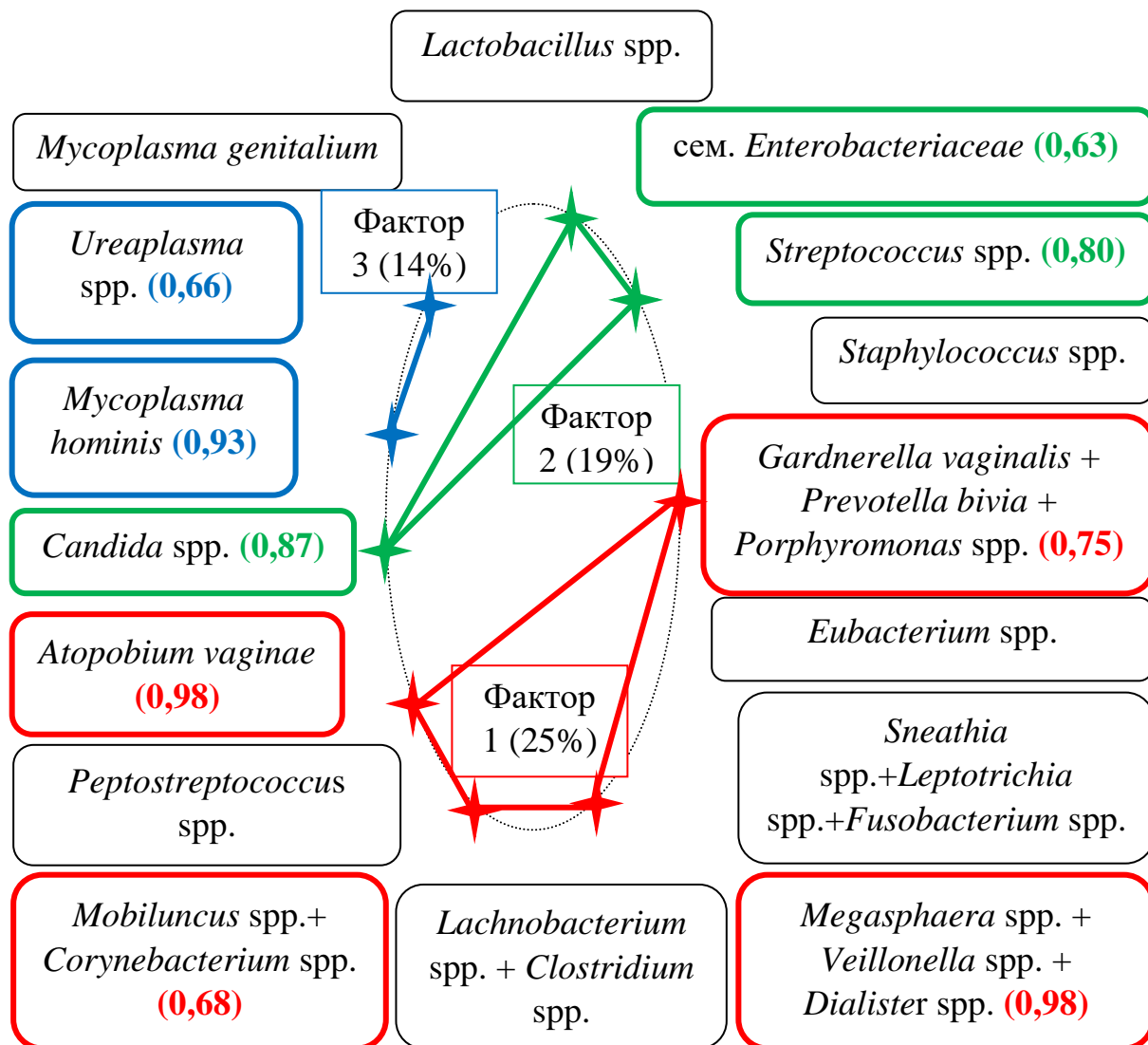


Рисунок 2 – Структура взаимосвязей микроорганизмов в эндометрии пациенток I группы. Процентом (%) обозначена доля объясняемой фактором дисперсии, цифровое значение в скобках – факторная нагрузка

При слабо выраженных морфологических признаках хронического эндометрита (II группа) в эндометрии была выявлена следующая ассоциация: *Mobiluncus spp.+Corynebacterium spp.* и *Eubacterium spp.* (рисунок 3).

У пациенток с умеренными и выраженными морфологическими признаками хронического эндометрита (III группа) была выявлена ассоциация между стафилококками, стрептококками и энтеробактериями, также была выявлена взаимосвязь между бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом (*Gardnerella vaginalis+Prevotella bivia+Porphyromonas spp.*, *Megasphaera spp.+ Veillonella spp.+Dialister spp.*, *Eubacterium spp.*) (рисунок 4).

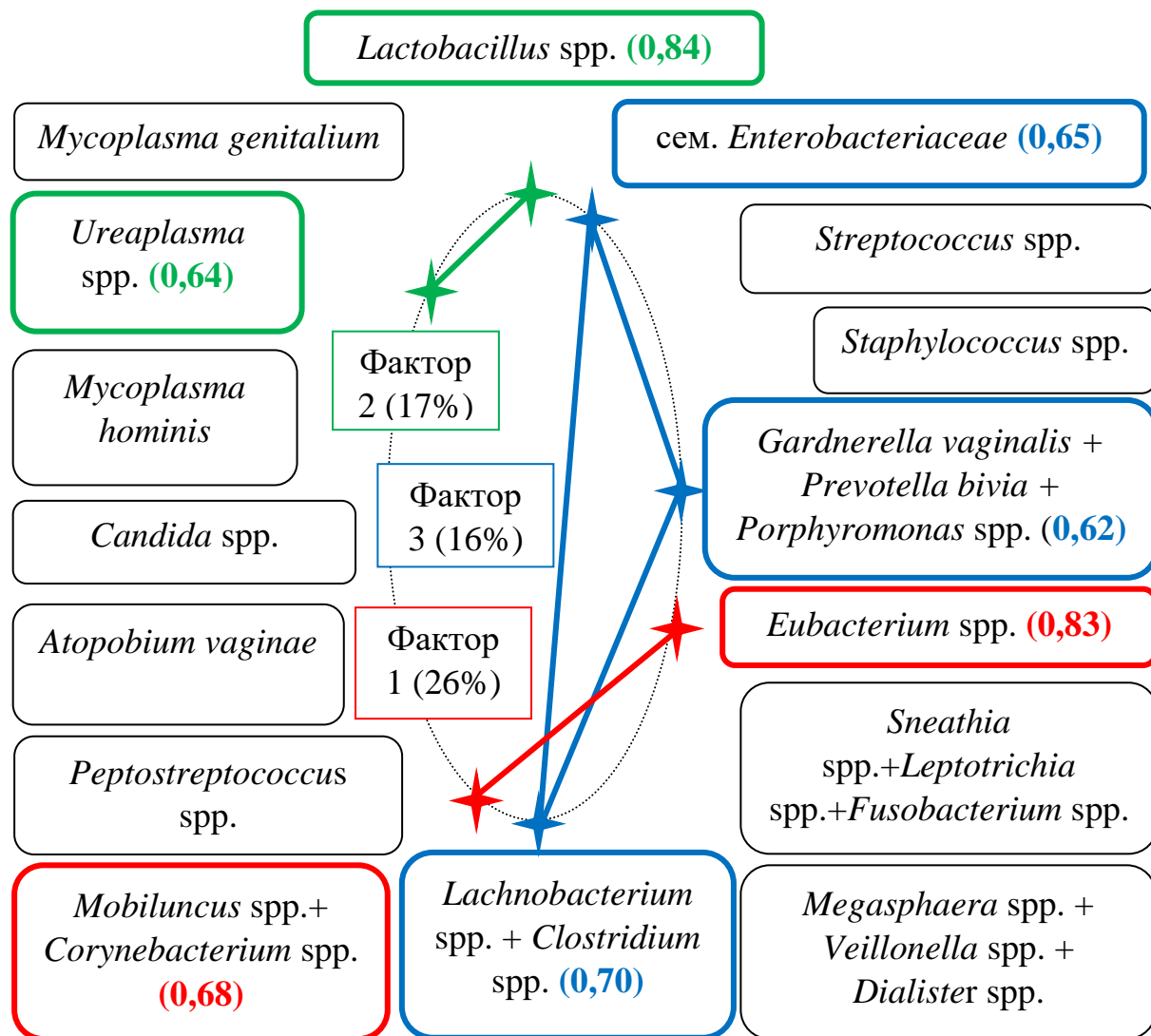


Рисунок 3 – Структура взаимосвязей микроорганизмов в эндометрии пациенток II группы. Процентом (%) обозначена доля объясняемой фактором дисперсии, цифровое значение в скобках – факторная нагрузка

Таким образом, микробиота эндометрия при хроническом воспалении представляет собой совокупность функционально связанных условно-патогенных микроорганизмов. При этом состав группы микроорганизмов, находящихся в функциональной взаимосвязи, и степень морфофункциональной трансформации эндометрия взаимосвязаны.

Полученные нами данные подтверждаются также результатами исследований, посвящённых формированию биопленок в эндометрии (Machado A. et al., 2013; Swidsinski A. et al., 2013).

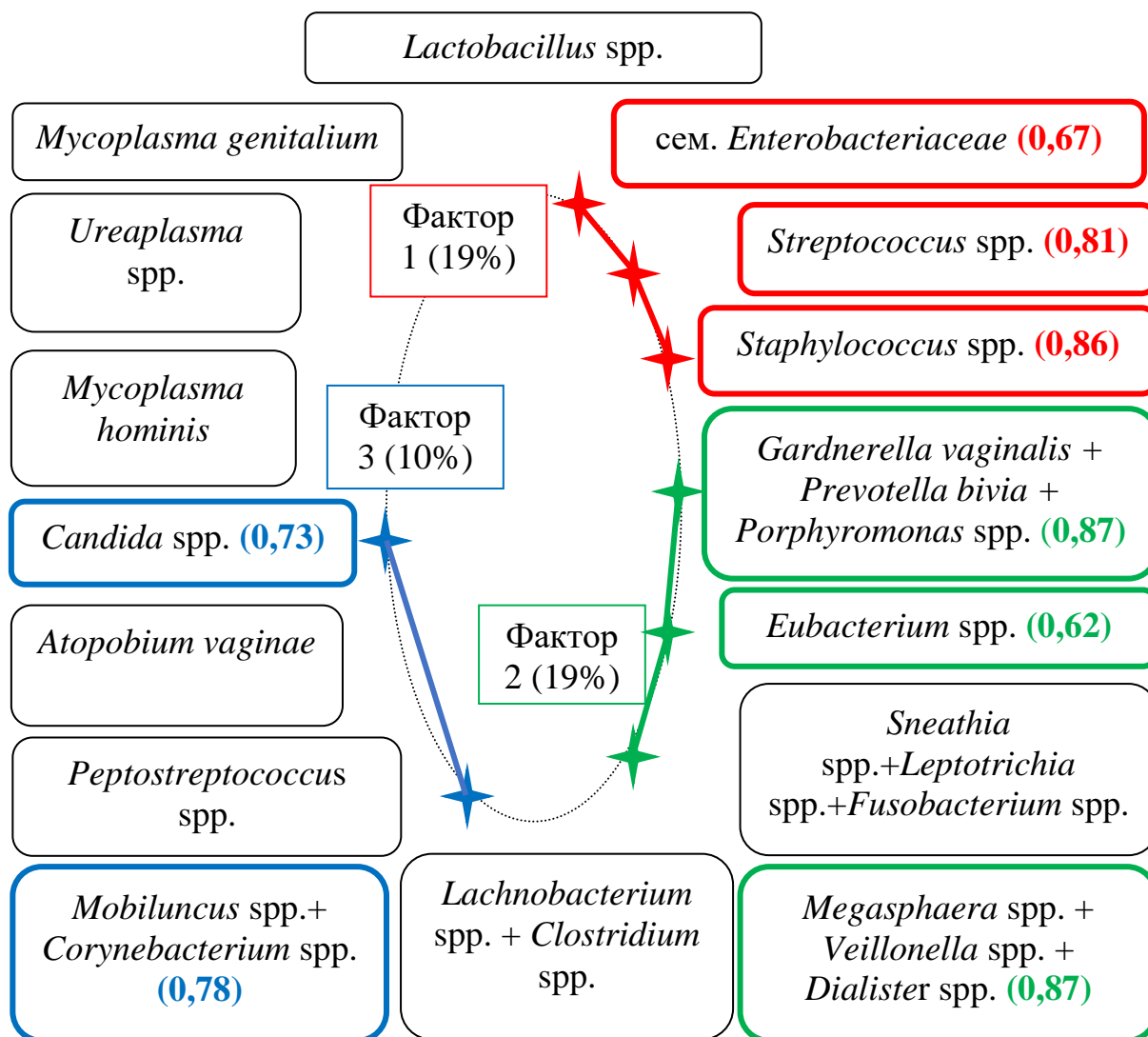


Рисунок 4 – Структура взаимосвязей микроорганизмов в эндометрии пациенток III группы. Процентом (%) обозначена доля объясняемой фактором дисперсии, цифровое значение в скобках – факторная нагрузка

Результаты корреляционного анализа взаимосвязи между данными акушерско-гинекологического анамнеза, результатами микробиологического и морфологического анализа биоптата эндометрия у пациенток обследованных групп

Определена достоверная отрицательная взаимосвязь между содержанием в эндометрии бактерий семейства *Enterobacteriaceae* ($r^2=-0,25$, $p=0,02$) и *Candida* spp. ($r^2=-0,21$, $p=0,03$) и количеством выскабливаний полости матки; заметная положительная взаимосвязь между количеством гистероскопий и содержанием в эндометрии *Lachnobacterium* spp.+*Clostridium* spp. ($r^2=0,21$, $p=0,03$).

Выявлена достоверная отрицательная корреляция между субпопуляционным составом лимфоцитов и частотой детекции следующих микроорганизмов:

Lactobacillus spp. ($r^2=-0,25$, $p<0,01$), *Eubacterium* spp. ($r^2=-0,41$, $p<0,01$). Доказана значимая положительная корреляционная связь между количеством CD138+ и *Streptococcus* spp. ($r^2=0,53$, $p<0,01$), заметная положительная связь – с *Staphylococcus* spp. ($r^2=0,39$, $p<0,01$) и *Enterobacteriaceae* spp. ($r^2=0,31$, $p<0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лактобациллы и эубактерии не ассоциированы с развитием воспалительной реакции в эндометрии.

Таким образом, полученные нами данные позволили предположить наличие функциональной системы "микробиота-эндометрий", которая характеризуется преобладанием лактобацилл. В результате действия факторов риска возможно изменение ее состава с формированием устойчивых ассоциаций условно-патогенной микрофлоры, что, в свою очередь, может приводить к нарушению морфофункционального состояния эндометрия, повреждению трофобласта, нарушению процессов имплантации и неэффективным протоколам экстракорпорального оплодотворения (рисунок 5).

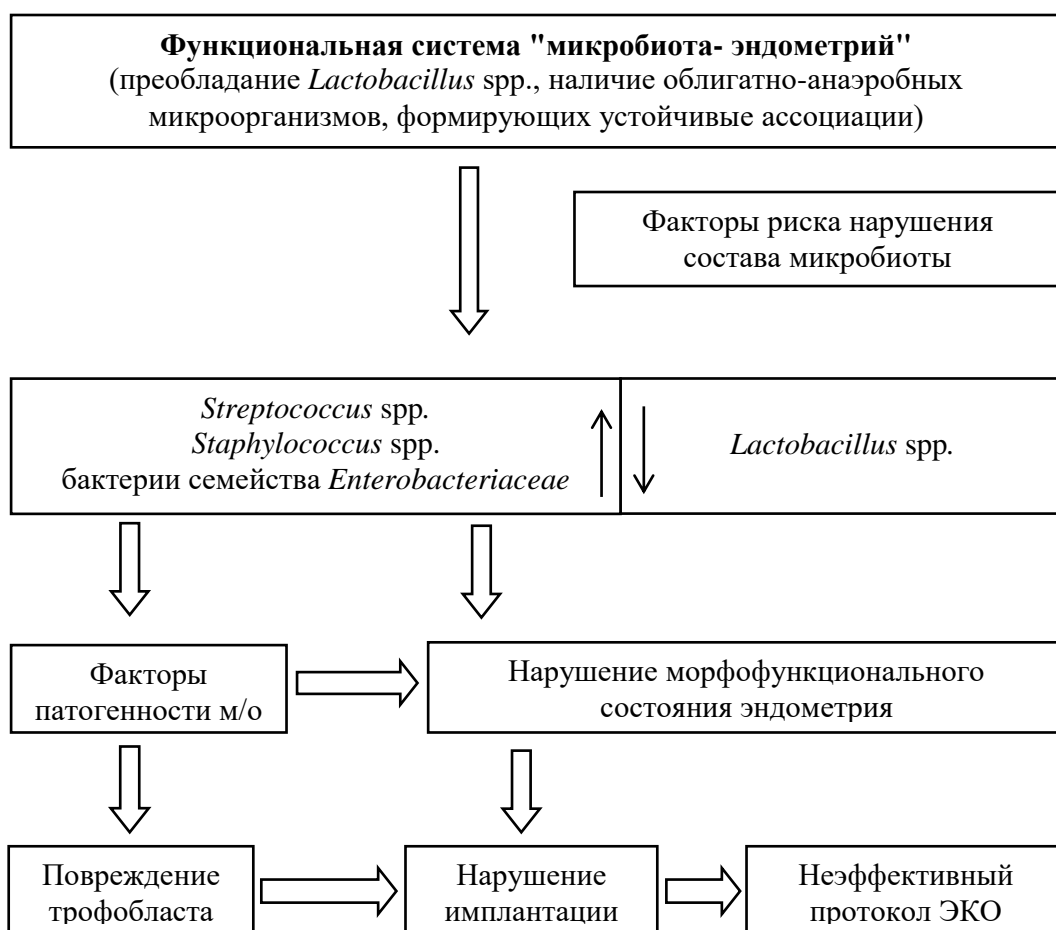


Рисунок 5 – Схема, отображающая влияние условно-патогенной флоры эндометрия на имплантацию

Эффективность протоколов ВРТ после применения различных методов лечения

Как видно из данных, представленных на рисунке 6, в группах пациенток, получавших антибактериальное лечение или комбинированное лечение, частота наступления биохимической беременности составила 56,5% и 75,8%, соответственно ($p=0,04$ и $p=0,002$) и частота клинической беременности составила 52,2% и 68,9%, соответственно ($p=0,03$ и $p=0,002$), что достоверно превышает таковую у пациенток без терапии (27,7% и 22,2%).

От общего количества наступлений беременности частота родов в группе пациенток, получавших антибактериальное лечение, составила 83,4%, в группе с применением комбинированного лечения – 85%, в группе без лечения – 50% (различия статистически не достоверны).

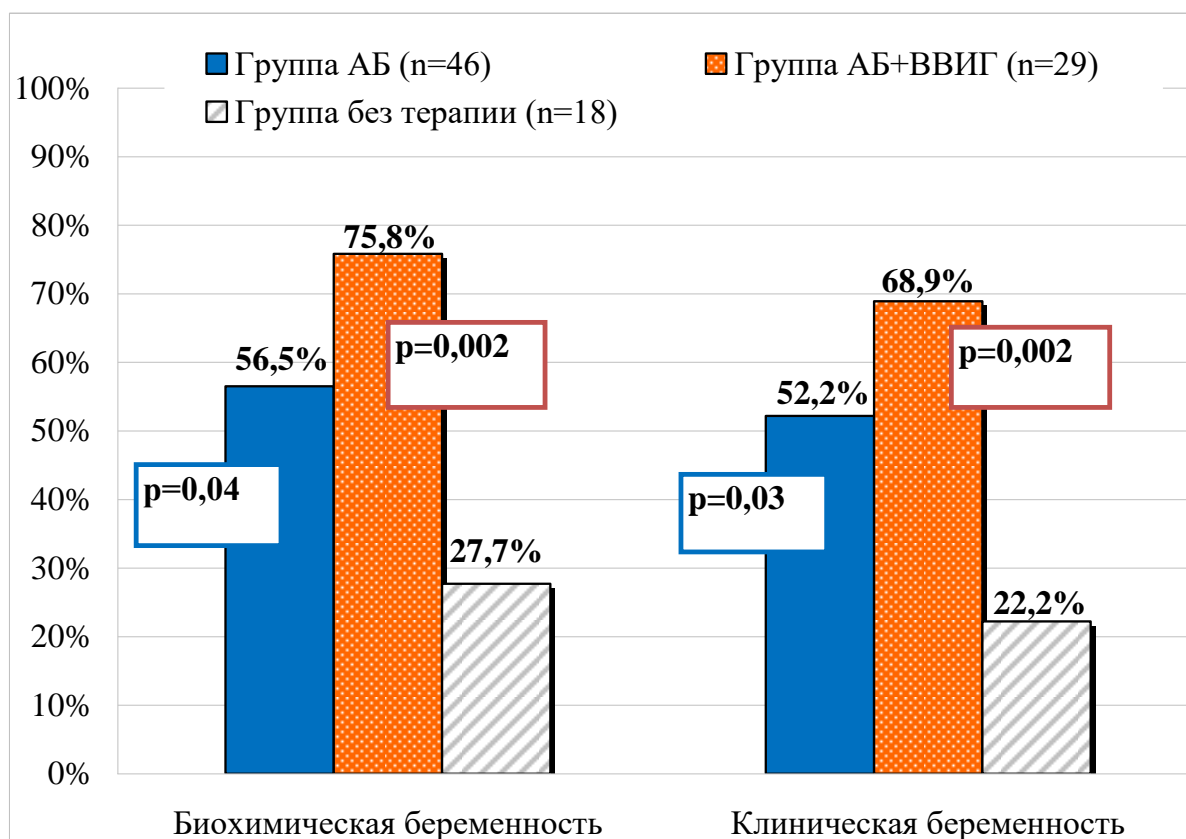


Рисунок 6 – Частота биохимической и клинической беременности у пациенток после применения различных методов лечения ХЭ. АБ – эмпирическая антибактериальная терапия; ВВИГ – внутривенные иммуноглобулины

Положительный эффект применения антибактериальной терапии может быть обусловлен, помимо прямого бактериостатического действия, иммуномодулирующим действием макролидов. Так, в исследовании Ortega E. et

al. (2004) показано, что макролидные антибиотики увеличивают активность Th1 клеток иммунного ответа, увеличивают секрецию ими IL-12 и IL-18, а также способны усиливать секрецию IL-4 и активировать Th2-иммунный ответ. Макролиды могут подавлять также факторы патогенности некоторых микроорганизмов, тем самым препятствуя их инвазии и формированию биопленок (Khan S., et al., 2012). Эффективность применения иммуноглобулинов для внутривенной инфузии обусловлена наличием широкого спектра антител против чужеродных антигенов, которые через неповрежденные Fc-фрагменты взаимодействуют с Fc-рецепторами на клетках иммунной системы организма (Gilardin L. et al., 2015), изменением продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (Pottier L.L. et al., 2007; Сидельникова В.М., 2011), способностью оказывать защитное действие в отношении эндотелиальных клеток от эндотелиотоксических факторов (Чепанов С.В., 2017), а также возможностью иммуноглобулинов поддерживать аутоотолерантность и снижать иммуноопосредованное воспаление (Сельков С.А., 2013).

***Оценка факторов, оказывающих влияние на эффективность терапии
хронического эндометрита (дискриминантный анализ)***

Для выявления данных (переменных), максимально влияющих на наступление беременности, и построения прогнозирующей функции проводилась процедура пошагового дискриминантного анализа. Получены дискриминантные переменные, которые оказывают наибольшую значимость на наступление беременности (таблица 2). Ими оказались: применение внутривенных иммуноглобулинов в протоколе ВРТ, количество CD20+ в строме эндометрия, выявленные при иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) и количество *Streptococcus* spp., выявляемое в эндометрии методом ПЦР-РВ, выраженное в Ig ГЭ/мл.

Таблица 2 – Признаки, влияющие на наступление беременности у пациенток после проведенного лечения

Дискриминантные переменные	Дискриминантный коэффициент
Применение иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) в протоколе ВРТ	1,88082
Количество В-лимфоцитов (CD20+) в поле зрения в эндометрии при ИГХ	0,06220
Кол-во <i>Streptococcus</i> spp. выявляемое в эндометрии методом ПЦР-РВ (lg ГЭ/мл)	-0,31372
Constant	-0,38466

Таким образом, проведенное исследование позволило установить клиничко-анамнестические особенности пациенток с бесплодием и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе, определить особенности микробиоты их эндометрия и зависимость этого показателя от морфофункционального состояния эндометрия и сформулировать направления прееконцепционной подготовки, существенно повышающие эффективность преодоления бесплодия с помощью методов вспомогательных репродуктивных технологий.

ВЫВОДЫ

1. Пациентки с бесплодием и неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе имеют высокую частоту гистероскопий (70%), искусственных абортов (25%), хронического эндометрита (80%), вторичного бесплодия (40%) и невынашивания беременности (25%); у половины из них при хроническом эндометрите имеют место нарушения менструальной функции, а эндометрий визуально характеризуется неравномерной толщиной и усилением сосудистого рисунка.

2. В эндометрии без морфологических признаков хронического воспаления с наиболее высокой частотой выявляются лактобациллы (85%) и эубактерии (78,6%); при хроническом эндометрите микробиота эндометрия характеризуется снижением частоты детекции и количества лактобацилл (до 50%) и увеличением – стрептококков (в 8 раз; до 56%), стафилококков

(в 1,5 раза; до 80%) и энтеробактерий (в 1,5 раза; до 60%), которые формируют при выраженном воспалении устойчивую ассоциацию.

3. В эндометрии пациенток с неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе при наличии хронического эндометрита и без такового в число микробиоты включены устойчивые ассоциации облигатно-анаэробных микроорганизмов, качественный состав которых определяется выраженностью воспалительной реакции.

4. Состав микробиоты эндометрия и выраженность иммунопатологических реакций в эндометрии взаимосвязаны; имеется позитивная взаимосвязь между количеством клеток CD138+ и количеством стрептококков ($r^2=0,53$), стафилококков ($r^2=0,39$), энтеробактерий ($r^2=0,31$) и отрицательная – с количеством зубактерий ($r^2=-0,41$) и лактобацилл ($r^2=-0,25$).

5. Внутриматочные вмешательства являются фактором, влияющим на состав микробиоты эндометрия; количество гистероскопий имеет прямую взаимосвязь с содержанием в эндометрии клостридий и лакнобактерий ($r^2=0,21$), а число выскабливаний полости матки - обратно коррелирует с содержанием энтеробактерий ($r^2=-0,25$) и грибов рода *Candida* ($r^2=-0,21$).

6. Применение в преконцепционный период у пациенток с бесплодием, неэффективными протоколами ЭКО в анамнезе и хроническим эндометритом антибактериальной терапии и сочетанной с внутривенными иммуноглобулинами повышает частоту наступления клинической беременности (в 2,5 раза) и родов (в 3 раза); фактором, повышающим шансы наступления беременности, является применение иммуноглобулинов для внутривенной инфузии; фактором, снижающим эффект от проводимой терапии, – детекция в эндометрии *Streptococcus* spp.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью микробиологического исследования биоптата эндометрия рекомендовано использовать модифицированную методику, включающую в себя следующие этапы: а) двукратную обработку влагалища и влагалищной части шейки матки антисептиком; б) введение прозрачного проводника из поливинилхлоридного материала диаметром 3 мм под визуальным контролем в

цервикальный канал; в) получение клинического материала из полости матки атравматической аспирационной кюреткой "Pipelle de Cornier" через проводник, находящийся в цервикальном канале (для исключения контаминации с его микрофлорой).

2. Для определения состава микробиоты эндометрия может быть применена методика ПЦР в реальном времени, с использованием реагентов Фемофлор.

3. С целью повышения эффективности преодоления бесплодия у пациенток с хроническим эндометритом и неудачными протоколами ЭКО в анамнезе в прекоцепционный период рекомендовано использовать два сопоставимых по эффективности варианта терапии:

а) антибактериальную: комбинация двух антибактериальных препаратов широкого спектра действия – макролид (джозамицин 1,5 г/день) и цефалоспорины III поколения (цефиксим 400 мг/день) в течение 14 дней (согласно стандартам Европейской ассоциации по лечению ВЗОМТ от 2012 г);

б) комбинированную с иммуноглобулинами для внутривенного введения ("Иммуновенин" производства Микроген НПО, Россия): 100 мл (5 г) внутривенно капельно за 24 ч до переноса эмбрионов и 100 мл (5 г) через 7 дней после переноса эмбрионов. Суммарная доза составляет 10 г – 200 мл.

4. Для определения прогноза наступления беременности у пациенток с хроническим эндометритом и неудачными протоколами ЭКО в анамнезе рекомендовано использовать расчет следующего показателя:

$$D_0 = 1,88082 \times ИГ + 0,06220 \times CD20 - 0,31372 \times Streptococcus\ spp. - 0,38466,$$

где ИГ – использование в прекоцепционный период внутривенных иммуноглобулинов;

CD20 – количество В-лимфоцитов в поле зрения в эндометрии при ИГХ;

Streptococcus spp. – количество микроорганизмов, выявленное в эндометрии методом ПЦР-РВ, выраженного в Ig ГЭ/мл.

При $D_0 > 0$ – прогнозируется наступление беременности; при $D_0 \leq 0$ – прогнозируется неэффективный протокол ВРТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Состав микробиоты эндометрия и степень выраженности хронического эндометрита у пациенток с неэффективными протоколами экстракорпорального оплодотворения – есть ли связь? / Н.Д. Цыпурдеева, Е.В. Шипицына, А.М. Савичева, А.М. Гзгзян, И.Ю. Коган // Журнал Акушерства и женских болезней. – 2018. – Т.67, №2. – С. 5-11.

2. Особенности микробиотопа эндометрия у пациенток с неэффективными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе и хроническим эндометритом / Н.Д. Цыпурдеева, И.Ю. Коган, А.М. Савичева, Г.Х. Толибова // Журнал Акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.65, спецвыпуск. – С. 27-28.

3. Клинико-морфологические детерминанты бесплодия, ассоциированные с воспалительными заболеваниями органов малого таза / Э.К. Айламазян, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, Н.Д. Цыпурдеева, И.К. Юркова, М.И. Кахиани, И.Ю. Коган, И.М. Кветной // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т.64, № 6. – С.17-25.

4. Цыпурдеева, Н.Д. Частота выявления хронического эндометрита у пациенток с нарушением репродуктивной функции / Н.Д. Цыпурдеева, Г.Х. Толибова // Снегиревские чтения "Инновационные технологии в акушерстве и гинекологии" Российская научно-практическая конференция с международным участием: сборник материалов секции молодых исследователей. – М.: Издательство Первого московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, 2015. – С.100-102.

5. Endometrial microbiotop of women with unsuccessful attempts of in vitro fertilization and chronic endometritis / N. Tsypurdeeva, I. Kogan, A. Gzgzyan, A. Savicheva, G. Tolibova // 17th World congress of the Academy of Human Reproduction. Rome, 15-18 March 2017. (poster).