

КЕБУРИЯ

Лела Капитоновна

**ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОТЫ МАТКИ НА ИСХОДЫ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинский наук, доцент
доктор медицинский наук

Смольникова Вероника Юрьевна
Припутневич Татьяна Валерьевна

Официальные оппоненты:

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта» Минобрнауки России, отделение вспомогательных репродуктивных технологий, руководитель

Вартанян Эмма Врамовна – доктор медицинских наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, профессор кафедры.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» марта 2022 г. В 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Keburya%20LK-disser.pdf?2126522239>

Автореферат разослан « » _____ 2022

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время проблема бесплодия является одной из самых актуальных и приоритетных в медицине развитых стран, учитывая неблагоприятные демографические показатели народонаселения.

Одной из причин неэффективности ЭКО являются неудачи имплантации, которые могут возникнуть при: нарушении рецептивности эндометрия, которое обусловлено различными гинекологическими заболеваниями (Тихончук Е.Ю. и соавт., 2016); наличии хромосомных аномалий у эмбриона (Сафронова Н.А. и соавт., 2016); утолщении *zona pellucida*, затрудняющей высвобождение эмбриона и его прикрепление к эндометрию (Шалфеи Р.А. и соавт., 2017).

Предметом исследований последних лет является изучение микробиоты матки и её влияния на успешность имплантации. Микробиота – это совокупность микроорганизмов, представленных в отдельном биотопе человека, находящихся в симбиозе с организмом хозяина. Несмотря на то, что эти симбиотические отношения сложились эволюционно, наше понимание физиологической и патофизиологической роли микробиоты в организме человека остаётся недостаточным (Moreno I. et al., 2017).

Важность физиологической роли микробиоты различных биотопов продемонстрирована на здоровых волонтерах в исследовании «Human Microbiome Project» (НМР), проведенном сотрудниками Национального Института Здоровья США в 2007 году с использованием высокочувствительных молекулярно-генетических методов. Были изучены образцы биоматериала, полученные из полости рта, носа, с поверхности кожи, фекальные пробы. У женщин исследовали отделяемое влагалища и аспират из полости матки. Данные НМР и последующих исследований показали, что в организме человека такие биотопы, как полость матки и плацента, ранее считавшиеся стерильными, колонизированы своей уникальной микрофлорой (Franasiak JM et al, 2016).

Данные о нормальной микробиоте полости матки не столь распространены, в связи с чем необходима разработка новых исследовательских направлений, таких, как культуromика и полногеномное секвенирование с последующей оценкой роли бактериальных взаимодействий и их влияния на нормальные и патологические процессы в области репродуктивного тракта. В связи с этим актуальность данного исследования как с научной, так и с практической точки зрения не вызывает сомнений.

Степень разработанности темы исследования

До настоящего времени остаётся неясным какой состав микробиоты полости матки считается нормой, а какой – патологией, оказывая неблагоприятное воздействие на имплантацию. Необходимо проведение дальнейших исследований с целью оценки роли бактериальных взаимодействий и их влияния на нормальные и патологические процессы в области репродуктивного тракта.

Цель исследования

Изучить влияние микробиоты матки на успешность имплантации, течение ранних сроков беременности, частоту живорождения у женщин в программе ЭКО/ИКСИ.

Задачи исследования

1. Оценить данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса у обследуемых пациенток с первой попыткой ЭКО и с повторными неудачами имплантации в анамнезе.
2. Оценить параметры фолликуло-, оогенеза и раннего эмбриогенеза при проведении программ ВРТ.
3. Оценить состояние микробиоты полости матки и цервикального канала у обследуемых женщин в момент переноса эмбриона.
4. Провести сравнительный анализ микробиоты матки в циклах стимуляции суперовуляции и в криоциклах.
5. Оценить влияние микробиоты матки и цервикального канала на репродуктивные исходы: успешность имплантации, наступление и течение

ранних сроков беременности, частоту живорождения у женщин с первой попыткой ЭКО, а также неудачами имплантации в анамнезе.

6. На основании полученных данных разработать алгоритм ведения пациенток в программах ВРТ с учетом полученных результатов.

Научная новизна

Впервые с использованием комплексного подхода методами культуромикрии и метагеномного анализа изучена микробиота полости матки и цервикального канала у женщин с I попыткой ЭКО и с повторными неудачами имплантации в анамнезе. В ходе исследования обнаружено, что полость матки колонизирована микроорганизмами. Обнаружено 44 вида микроорганизмов: 14 видов лактобацилл и 4 вида бифидобактерий, 26 видов условно-патогенных микроорганизмов. Выявлено, что стерильная полость матки не является предиктором успешной имплантации.

Сравнительный анализ культурального исследования и метагеномного секвенирования микробиоты полости матки продемонстрировали высокую степень совпадения полученных данных.

При сравнении видового разнообразия и частоты выделения отдельных видов микроорганизмов в момент переноса эмбриона выявлено, что у большинства женщин (87,9%) микробиота цервикального канала и полости матки отличалась по качественному составу.

Практическая значимость

Доказана взаимосвязь между количеством внутриматочных манипуляций в анамнезе и частотой наступления беременности у женщин в программах ВРТ. У женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе при наличии двух и более внутриматочных вмешательств частота наступления беременности снижается в 1,9 раз по сравнению с женщинами с отсутствием внутриматочных манипуляций.

Показана высокая информативность метода культуромикрии при исследовании микробиоты полости матки и цервикального канала. Однако метод

является трудоёмким и дорогостоящим. Ввиду малого количества материала, полученного из полости матки в момент переноса, проведение качественного и количественного анализа состава микробиоты полости матки молекулярно-биологическими методами (ПЦР, 16sRNA секвенирование) является затруднительным и нецелесообразным для применения в клинической практике. Применение методов культуромики и секвенирования видоспецифического участка гена 16sRNA целесообразно в научных исследованиях, но не в рутинной практике.

Разработан алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в зависимости от микробной колонизации полости матки и количественной микробной обсемененности цервикального канала. Лечение пациенткам целесообразно проводить при обнаружении УПМ в умеренных и высоких концентрациях в цервикальном канале (10^4 – 10^6 и более КОЕ/мл). При выявлении УПМ в умеренных количествах (до 10^5 КОЕ/мл) использование антибактериальных препаратов нецелесообразно. Альтернативными препаратами для профилактики и/или лечения могут быть средства с бактериофагами для местного (интравагинального) применения при наличии видоспецифических бактериофагов в составе препарата, идентичным обнаруженным УПМ в составе микробиоты цервикального канала или полости матки.

Положения, выносимые на защиту

1. У женщин с неудачными попытками ЭКО в анамнезе среди клинико-анамнестических показателей одним из наиболее значимых предикторов исхода программ ВРТ является количество предшествующих внутриматочных манипуляций: наличие двух и более внутриматочных вмешательств у женщин с повторными неудачами имплантации снижает шанс наступления беременности в 3,4 раза.

2. Сравнительные данные о составе микробиоты полости матки и цервикального канала подтверждают концепцию о нестерильности матки и существовании «самостоятельной» микробиоты, отличающейся от микробиоты нижних отделов репродуктивного тракта. Качественный состав и частота

выделения различных видов микроорганизмов, обнаруженных в полости матки и в цервикальном канале в общей когорте женщин, были идентичны только у 12,1% женщин, а у 87,9% - отличались.

3. Обнаружение УПМ в полости матки и в цервикальном канале в низких и умеренных титрах (до 10^5 КОЕ/мл) не является предиктором исхода программ ВРТ. Выделение УПМ, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*G. vaginalis*), из полости матки и цервикального канала в высоком титре (10^6 КОЕ/мл и более) во всех случаях сопровождалось либо ненаступлением беременности, либо ее прерыванием на ранних сроках, что можно расценивать как фактор риска неблагоприятных исходов ВРТ.

4. В связи с формированием высокой антибиотикорезистентности микроорганизмов при обнаружении УПМ в умеренных концентрациях (до 10^5 КОЕ/мл) в репродуктивном тракте женщин применение рутинной антибактериальной терапии нецелесообразно. Учитывая высокую частоту родов (88,8%) из расчета на количество наступивших беременностей, у женщин, получавших терапию бактериофагами, можно рассматривать их применение в качестве альтернативного способа коррекции дисбиотических нарушений.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проводился набор материала по теме диссертации, обследование и лечение пациенток, анализ медицинской документации, систематизация и компьютерная обработка полученных результатов исследований.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3 и 4 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени проф. Б.В. Леонова

23.06.2021 г. и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России (30.08.2021 г, протокол №5).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанные методы обследования и лечения внедрены и используются в практической работе в отделении вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (руководитель отделения – д.м.н., профессор Калинина Е.А).

По результатам исследования опубликовано 6 научных работ, из них 3 – в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ и Scopus, 1 – в международном журнале.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, включающие клиническую характеристику групп обследованных пациенток, данные микробиологических исследований, обсуждение полученных результатов, выводы и практические рекомендации. Библиографический указатель включает 56 отечественных и 65 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 22 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Проведено проспективное обследование супружеских пар в программах ВРТ. Предварительное обследование супружеской пары проводилось по месту жительства и/или в амбулаторных условиях ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в соответствии с приказом Минздрава России № 107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

В соответствии с целью исследования и поставленными для её решения задачами обследованы 130 пациенток репродуктивного возраста, проходившие лечение в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (рук. отд. – д.м.н., профессор Калинина Е.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Сухих Г.Т.). Критерии включения: возраст пациенток до 37 лет, трубно-перитонеальный фактор бесплодия, отсутствие тяжёлых форм патозооспермии (3-4 степень), регулярный менструальный цикл, отсутствие патологии эндометрия по данным УЗИ, перенос эмбрионов «хорошего» качества. Критерии исключения: противопоказания для проведения ЭКО, в том числе тяжёлая экстрагенитальная патология и онкологические заболевания в анамнезе, подтверждённый лапароскопически генитальный эндометриоз III-IV степени, интерстициальная и/или субсерозная миома матки более 4 см, субмукозная миома, деформирующая полость матки, патология эндометрия (в том числе хронический эндометрит). В соответствии с критериями включения и исключения отобраны все пациентки были разделены на три группы (рисунок 1).

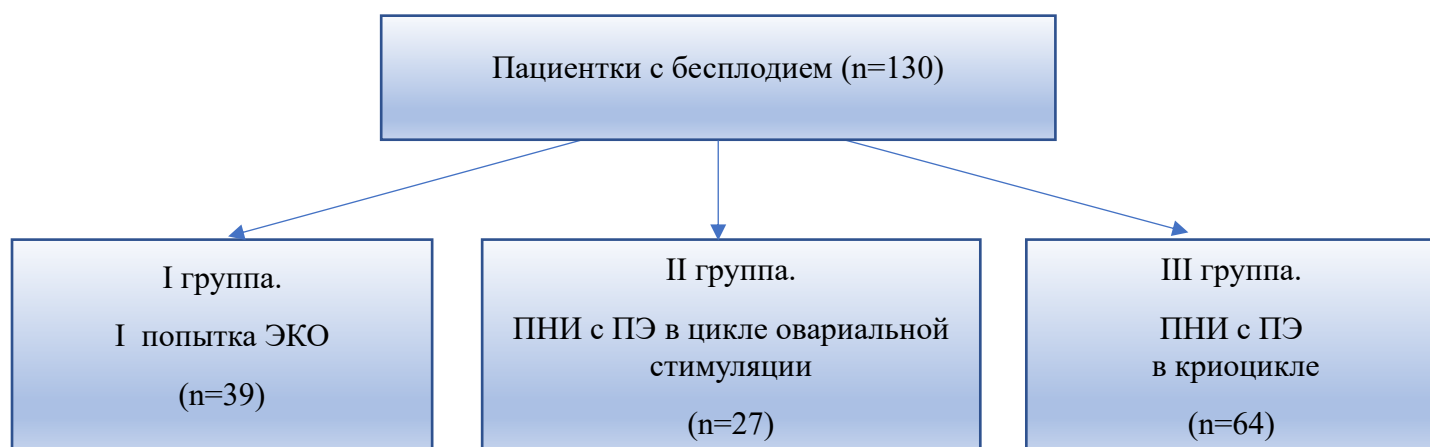


Рис. 1. Дизайн исследования

Стимуляция суперовуляции проводилась со 2-3 дня МЦ препаратами гонадотропинов (рФСГ/ЧМГ) по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ). Перенос эмбрионов осуществлялся под УЗ-контролем на 5-ые сутки культивирования. Проводился селективный перенос 1-

го эмбриона в полость матки «хорошего» или «отличного» качества. Перенос эмбрионов в криоциклах проводился в естественном овуляторном менструальном цикле на 5-6 день после овуляции, диагностированной при УЗ-мониторинге.

Всем женщинам перед переносом эмбриона в полость матки проведено микробиологическое исследование микробиоты цервикального канала. Взятие материала из цервикального канала осуществляли с помощью дакронового бактериологического тампона в пробирки с транспортной средой Эймса (Medical Wire, Англия). Состав микробиоты исследовали методом культуромики – с использованием расширенного набора селективных и неселективных питательных сред. После переноса эмбриона в полость матки дистальный фрагмент эмбриокатетера срезали стерильными ножницами и помещали в пробирку со средой накопления (1 мл), используемой для гемокультур (Oxoid, Великобритания). Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили методом времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) с помощью масс-спектрометра AutoFlex III с программным обеспечением Maldi BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) версии 3.0.

На втором этапе исследования были отобраны 30 образцов биоматериала из полости матки (фрагмент эмбриокатетера в среде накопления) для проведения высокопроизводительного секвенирования с целью сравнения с микробиологическими данными. Для определения видового состава микробиоты полости матки методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) были выбраны переменные регионы V3-V4. Секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, USA) на ячейках v2 согласно протоколу производителя. Анализ данных проводили с использованием программного пакета QIMME.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы IBM SPSS Statistics, версия 22. Статистически значимыми различия считали при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

На первом этапе работы нами был проведен анализ анамнестических, эмбриологических параметров. Оценка клинико-анамнестических данных,

менструальной, гормональной и репродуктивной функции, а также параметры эмбриогенеза у женщин в исследуемых группах не выявили статистических различий. Группы были сопоставимы по значимым параметрам и подобраны таким образом, что минимизировать влияние вмешивающихся факторов на исходы программ ВРТ. Исключение составила частота предшествующих внутриматочных манипуляций у женщин с ПНИ. У женщин с ПНИ частота внутриматочных манипуляций в анамнезе была выше (II группа - 33,3%) и (III группа - 35,9%) по сравнению с пациентками с I попыткой ЭКО (12,8%) ($p=0,05$; $p=0,01$). Нами была предпринята попытка оценить отношение шансов наступления беременности у женщин исследуемых групп. Было обнаружено, что шанс наступления беременности у женщин с I попыткой ЭКО и отсутствием внутриматочных манипуляций в анамнезе выше в 3,4 раза по сравнению с пациентками с ПНИ и наличием двух и более манипуляций в анамнезе (95% ДИ: 1,14-10,5). Таким образом, обнаружена связь между предшествующими внутриматочными манипуляциями и частотой наступления беременности. Полученные данные могут свидетельствовать как о негативном влиянии ранее выявленной внутриматочной патологии, так и о травматизации эндометрия при внутриматочных вхождениях и снижении рецептивности эндометрия, ведущих к неудачам имплантации. В настоящее время доказано, что внутриматочные вмешательства могут провоцировать деструктивное воздействие иммунокомпетентных клеток на ткани эндометрия и развитие хронического аутоиммунного процесса.

Вторым этапом нашего исследования было изучение состава микробиоты цервикального канала у пациенток обследуемых групп. У пациенток с I попыткой ЭКО в умеренном (10^4 - 10^5 КОЕ/мл) или в большом (10^6 КОЕ/мл и более) количестве наиболее часто выделяли лактобациллы, чаще у женщин с наступившей беременностью – 90,0%, чем с отсутствием -73,7% ($p>0,05$). УПМ выделяли преимущественно в низком титре (10^3 КОЕ/мл и менее). Однако *G. vaginalis* у забеременевших женщин выявлена только в умеренном титре (15,0%), а среди незабеременевших в низкой концентрации – 5,3% (в высокой - 10,5% и в

умеренной - 10,5% соответственно). Стрептококки у забеременевших женщин были обнаружены в низком и умеренном титрах с одинаковой частотой (10,0%), а у женщин с отсутствием беременности в 10,5% и 5,3% соответственно. Полная картина уровня микробной колонизации с учётом частоты встречаемости и количественной оценки микроорганизмов в I группе женщин показана на тепловой карте (рисунок 2). На рисунке 2 показано графическое изображение полученных данных и полный спектр микроорганизмов, обнаруженный у женщин I группы. Каждая тонкая горизонтальная линия представляет собой состав микробиоты одной женщины (n=39). Каждая ячейка отображает степень обсемененности микроорганизмами (метки справа) в lg КОЕ/мл.

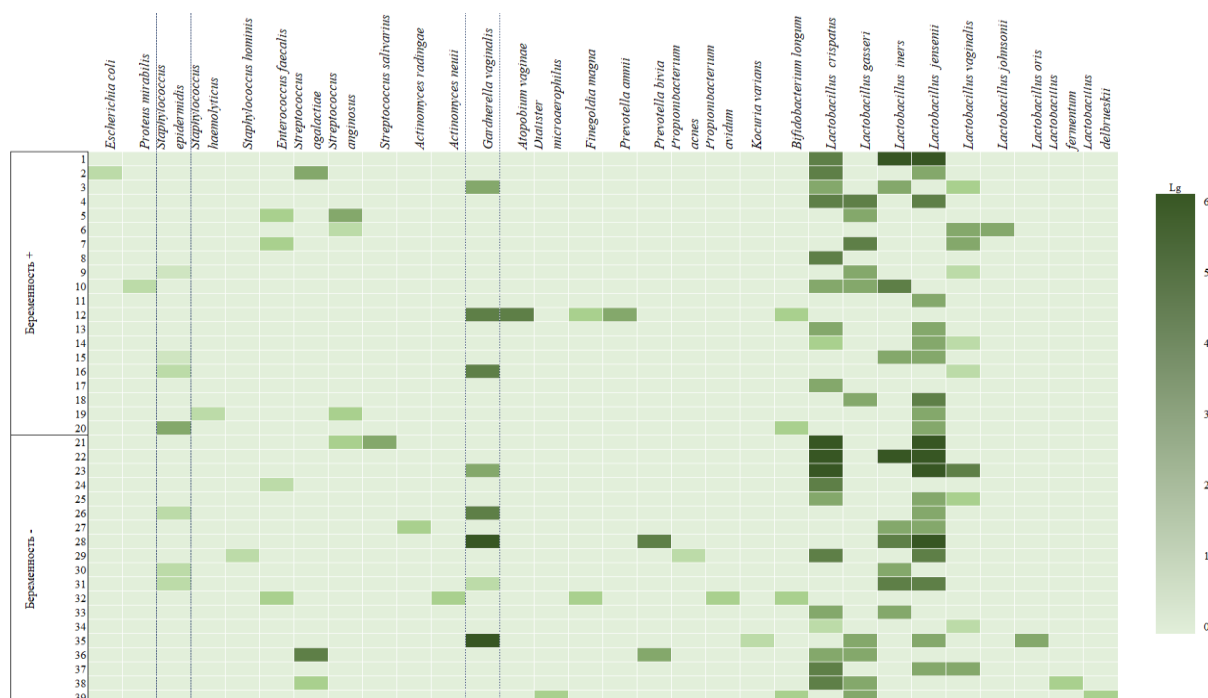


Рис. 2. Сравнительный анализ количественного состава микрофлоры, выделенной у пациенток с I попыткой ЭКО (n=39)

У женщин с ПНИ и ПЭ в цикле овариальной стимуляции (II группа) по сравнению с пациентками I группы лактобациллы в умеренном или в большом количестве чаще выделяли у незабеременевших – 63,2%, чем у забеременевших женщин – 50,0% ($p > 0,05$). Среди УПМ энтерококк и коагулазоотрицательные стафилококки обнаружены только в низкой концентрации, стрептококки в обеих группах высевали преимущественно в низком и умеренном титре при доминировании в группе женщин с отсутствием беременности (12,5% и 15,8%

соответственно). Гарднерелла обнаружена в обеих подгруппах в умеренном количестве (12,5% и 26,3% соответственно) и в высоком титре (5,3%) у женщин с отсутствием беременности. Строгие анаэробы в низком и умеренном титре выделяли чаще у забеременевших женщин с одинаковой частотой (12,5%), а у женщин с отсутствием беременности – только в умеренном титре (10,5%). Полная картина уровня микробной колонизации с учётом частоты встречаемости и количественной оценки микроорганизмов во II группе женщин показана на рисунке 3.



Рис. 3. Сравнительный анализ количественного состава микрофлоры, выделенной у пациенток с ПНИ и ПЭ в цикле овариальной стимуляции (n=27)

У пациенток с ПНИ и ПЭ в криоцикле (III группа) в умеренном или большом количестве лактобациллы выделяли чаще у женщин с наступившей беременностью, чем с отсутствием (60,9% и 51,2% соответственно) ($p>0,05$). УПМ выделяли преимущественно в низком титре. Исключение составляет гарднерелла, которая обнаружена в обеих подгруппах только в умеренном количестве (4,3% и 7,3% соответственно), а также строгие анаэробы, которые у забеременевших женщин выявляли только в низкой концентрации (13,0%), а среди пациенток с отсутствием беременности – с одинаковой частотой в низком и умеренном титре (по 9,75%). Полная картина уровня микробной колонизации с учётом частоты

встречаемости и количественной оценки микроорганизмов в III группе женщин показана на рисунке 4.

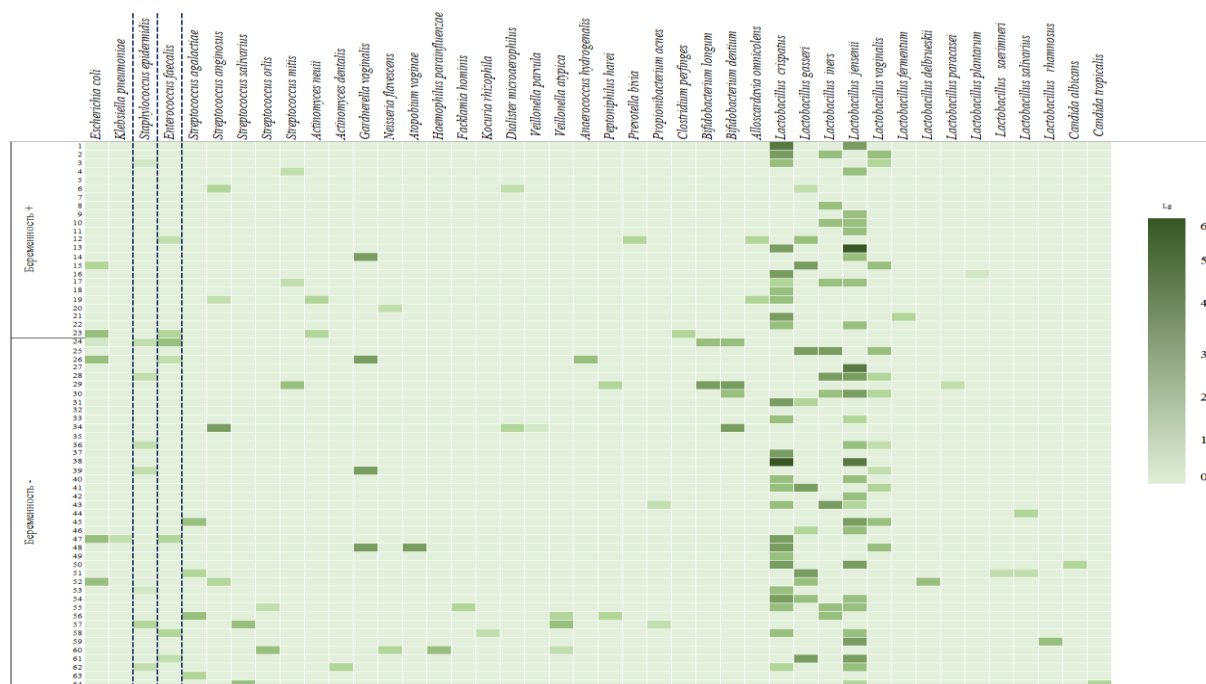


Рис. 4. Сравнительный анализ количественного состава микрофлоры, выделенной у пациенток с ПНИ и ПЭ в криоцикле (n=64)

Таким образом, наличие в цервикальном канале, анатомически максимально приближенном к полости матки микроорганизмов, в том числе УПМ в умеренном титре не обязательно влияет на процесс имплантации и наступление беременности. Однако выделение УПМ, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*G. vaginalis*), из полости матки и цервикального канала в высоком титре (10^6 КОЕ/мл и более) во всех случаях сопровождалось либо ненаступлением беременности у женщин исследуемых групп, либо ее прерыванием на ранних сроках, что можно расценивать как фактор риска неблагоприятных исходов ВРТ.

Отдельным этапом нашего исследования явилась оценка микробиоты полости матки в момент переноса эмбриона у обследуемых групп и её влияние на репродуктивные исходы. Нужно отметить, что результаты исследования методом культуромики были положительными в 90% случаев. Мы обнаружили, что полость матки не является свободной от микроорганизмов, и в этом наши результаты совпадают с результатами других авторов (Franasiak JM et al., 2017). Среди факультативно-анаэробных УПМ у женщин с наступившей беременностью

наиболее часто были выделены *E. faecalis* и стрептококки с одинаковой частотой (15,0%). *G. vaginalis* (5,0%) и облигатно-анаэробные микроорганизмы (10,0%). У женщин с отсутствием беременности частота выделения лактобацилл оказалась несколько ниже, чем у женщин с наступившей беременностью (73,7%). В составе УПМ наиболее часто встречались коагулазоотрицательные стафилококки (15,8%) и стрептококки (15,8%). Обращает на себя внимание, что *G. vaginalis* и облигатно-анаэробные УПМ выделены у 21,0% женщин (рисунок 5).

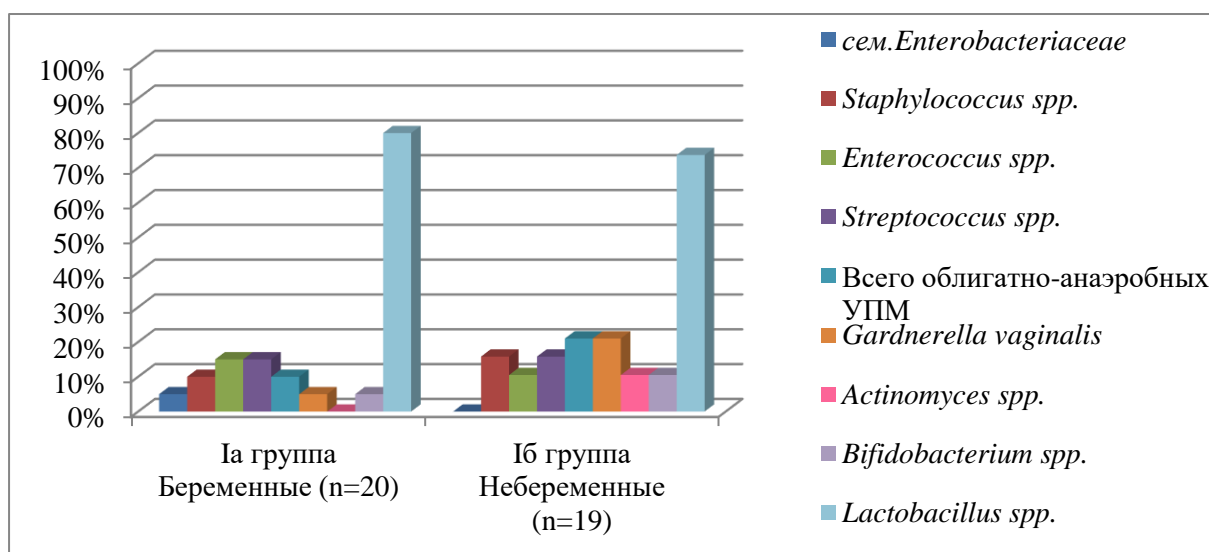


Рис.5. Частота выделения различных микроорганизмов из полости матки у пациенток с I попыткой ЭКО в зависимости от наступления беременности или ее отсутствия (n=39)

Во II группе среди женщин с наступившей беременностью наиболее часто выделяемыми микроорганизмами оказались лактобациллы (90,2%). Среди УПМ доминировали факультативные анаэробы: стрептококки (25,0%), стафилококки, энтеробактерии (12,5%). Частота выделения облигатно-анаэробных микроорганизмов оказалась статистически выше (37,5%), чем у женщин с отсутствием беременности (0%) ($p=0,03$). У женщин с отсутствием беременности колонизация матки лактобациллами оказалась несколько ниже – 79,0%. В составе УПМ чаще высеивали факультативные анаэробы: стрептококки (21,0%) и коагулазоотрицательные стафилококки (15,8%). Частота выделения *G. vaginalis* составила 10,5%. Сравнительный анализ микробиоты полости матки у женщин данной группы с наступившей беременностью и её отсутствием представлен на рисунке 6.

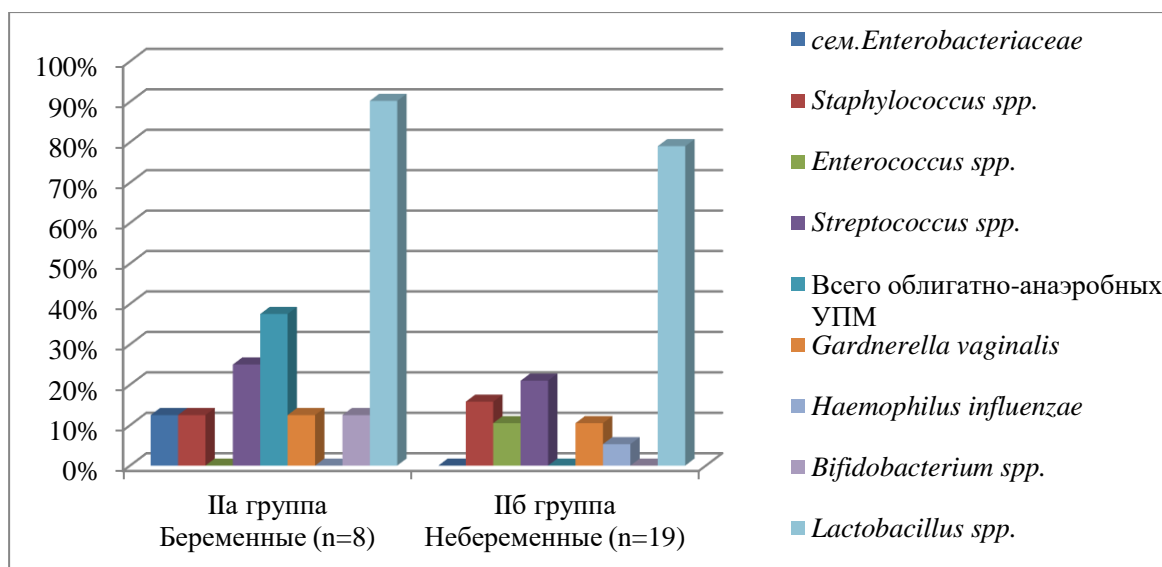


Рис.6. Частота выделения различных микроорганизмов из полости матки у женщин с ПНИ и ПЭ в цикле овариальной стимуляции в зависимости от наступления беременности или ее отсутствия (n=27)

Примечание: Па- Пб облигатно-анаэробные УПМ (p=0,03)

У женщин III группы с наступившей беременностью частота выделения лактобацилл составила 60,9%. Среди УПМ наиболее часто выделяли факультативные анаэробы: коагулазоотрицательные стафилококки (17,4%), стрептококки (17,4%), энтеробактерии (13,0%) и энтерококки (8,7%). Обращает на себя внимание отсутствие облигатно-анаэробных микроорганизмов, а также *G. vaginalis*. Частота выделения у лактобацилл у женщин с отсутствием беременности составила 75,6%. В составе УПМ также преобладали факультативные анаэробы: стрептококки (21,95%), коагулазоотрицательные стафилококки (29,3%) и энтерококки (7,3%). Частота выделения *G. vaginalis* и облигатных анаэробов составила 2,4%. Сравнительный анализ микробиоты полости матки среди женщин с наступившей беременностью и её отсутствием представлен на рисунке 7.

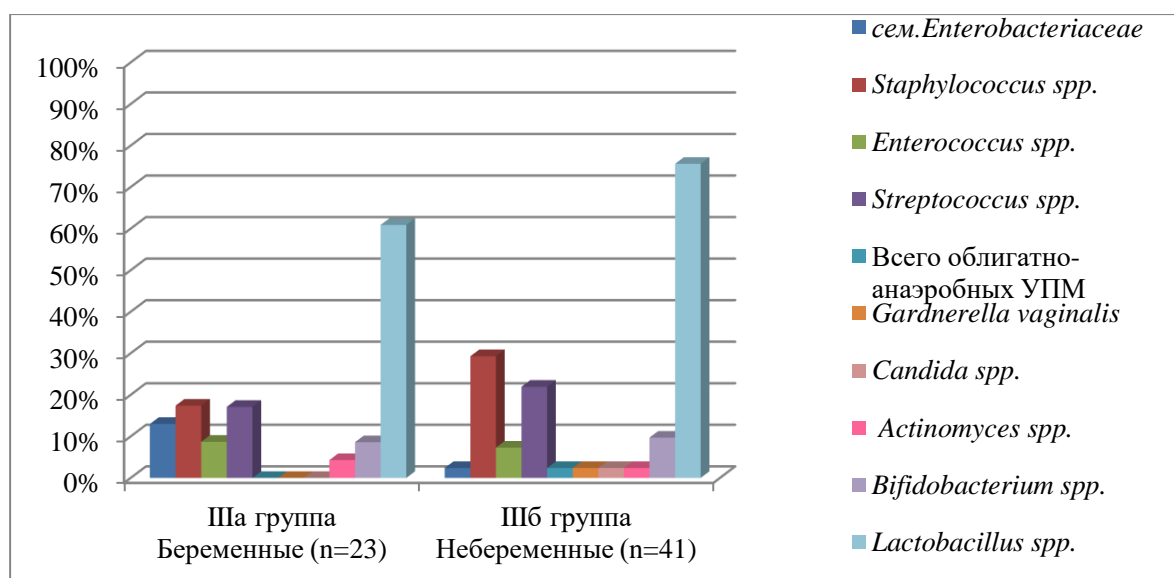


Рис. 7. Частота выделения различных микроорганизмов у женщин с ПНИ и с ПЭ в криоцикле в зависимости от наступления беременности или ее отсутствия (n=64)

Проведена сравнительная оценка микробиоты полости матки между исследуемыми группами женщин. По данным культурального исследования содержимого полости матки 130 женщин, микрофлора обнаружена в 90% случаев. Установлено, что полость матки у женщин I, II и III групп стерильна только в 10,3%, 7,4% и 10,9% случаев соответственно. Доминирующими во всех группах были лактобациллы. Следует отметить, что высеваемость облигатно – анаэробных микроорганизмов и *G. vaginalis* была статистически значимо выше в I группе по сравнению с III группой (строгие анаэробы – 15,4% и 1,6%; *G. vaginalis* – 12,8% и 1,6% соответственно) ($p=0,02$; $0,05$). Доминирование облигатно-анаэробных микроорганизмов у женщин с ПНИ и ПЭ в цикле стимуляции с наступившей беременностью (37,5%) по сравнению с отсутствием (0%) ($p=0,03$) в микробиоте полости матки, не позволило выявить возможные колонизационные факторы риска, влияющие на частоту имплантации, учитывая маленькую выборку.

Отдельным этапом нашего исследования был анализ результатов метагеномного исследования, для которого были отобраны 30 образцов биоматериала из полости матки. Для образцов со стерильной полостью матки во всех случаях была обнаружена крайне низкая концентрация бактериальной ДНК,

сопоставимая с концентрацией ДНК в отрицательных контрольных образцах. В этих образцах обнаруживались микроорганизмы родов *Lactobacillus*, *Tepidimonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, которые так же определяются в отрицательных контрольных образцах. В большинстве случаев представленность микроорганизмов в полости матки по данным культурального и метагеномного исследований совпадали. В некоторых случаях обнаружены рода бактерий, которые не выявлены при исследовании методом культуromики. Это может объясняться наличием в образце микроорганизмов, которые по разным причинам не выросли на питательных средах, но при этом их ДНК присутствует в образце. Секвенирование позволило нам определить количественное соотношение микроорганизмов, однако к этим данным стоит относиться с осторожностью, поскольку исследуются образцы питательной среды, а не непосредственно образец и соотношение может зависеть от скорости роста различных микроорганизмов.

С целью возможного влияния бактериальной обсемененности на репродуктивные исходы, нами проведён сравнительный анализ микробиоты полости матки и цервикального канала 130 женщин. Полость матки была стерильной у 14 (10,8%) женщин. Рост микрофлоры в цервикальном канале отсутствовал у 5 из 130 женщин (3,8%). При сравнении частоты выделения различных компонентов микробиоты полости матки и цервикального канала отмечено, что статистически значимая разница наблюдалась в частоте выявления *G. vaginalis* ($p=0,01$) и наиболее часто встречающихся видов лактобацилл: *L. crispatus* ($p=0,01$), *L. gasseri* ($p=0,01$), *L. vaginalis* ($p=0,01$) и *L. iners* ($p=0,01$). По остальным видам разница оказалась статистически не значимой ($p>0,05$). На основании полученных данных показано, что микрофлора полости матки идентична микрофлоре цервикального канала только у 12,1% женщин, а у 87,9% - имела отличия, что может свидетельствовать о возможности формирования в полости матки самостоятельной микробиоты. Таким образом, цервикальный канал и полость матки могут отличаться по видовому разнообразию

микроорганизмов, а полость матки характеризуется меньшим видовым разнообразием.

Для изучения возможного влияния гонадотропной стимуляции и, соответственно, гиперэстрогении на бактериальную обсемененность, нами проведён сравнительный анализ микробиоты полости матки 66 женщин с ПЭ в цикле овариальной стимуляции (I и II группы) и 64 женщин с ПЭ в криоцикле (III группа). Микробиота полости матки у женщин с переносом эмбриона в цикле стимуляции яичников статистически значимо отличалась от микробиоты женщин с переносом в криоцикле только по частоте выявления двух видов микроорганизмов: *S. epidermidis* и *G. vaginalis*. *S. epidermidis* статистически значимо чаще выделяли у женщин с ПЭ в криоцикле (у 12 из 64; 18,8%) в сравнении с женщинами с переносом в цикле овариальной стимуляции (у 4 из 66; 6,0%) ($p=0,05$). Напротив, *G. vaginalis* чаще обнаружена у пациенток с ПЭ в цикле овариальной стимуляции (у 8 из 66 женщин; 12,1%) в сравнении с пациентками с ПЭ в криоцикле (у 1 женщины из 64; 1,6%) ($p=0,04$).

Видовое разнообразие в полости матки у женщин с ПЭ в цикле овариальной стимуляции было выше (46 видов микроорганизмов), чем у женщин с ПЭ в криоцикле (35 видов микроорганизмов), что, вероятно, связано с супрафизиологической концентрацией половых и других гормонов в период стимуляции функции яичников. Наименьшее значение видового разнообразия в III группе женщин, возможно, связано с физиологическими концентрациями уровней эстрогенов и других гормонов.

Нами проведен анализ репродуктивных исходов у обследуемых групп женщин (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика исходов беременностей у пациенток обследуемых групп

Показатель	I попытка ЭКО (n=39)	ПНИ с ПЭ в цикле стимуляции (n=27)	ПНИ с ПЭ в криоцикле (n=64)
------------	-------------------------	--	-----------------------------------

Частота наступления беременности из расчета на перенос	51,3% (n=20)	29,6% (n=8)	35,9% (n=23)
Частота неразвивающейся беременности	5,0% (n=1/20)	12,5% (n=1/8)	17,4% (n=4/23)
Частота самопроизвольного прерывания беременности в I триместре	15,0% (n=3/20)	0% (n=0)	8,7% (n=2/23)
Преждевременные роды	5,0% (n=1/20)	12,5% (n=1/8)	0% (n=0)
Своевременные роды	75,0% (n=15/20)	75,0% (n=6/8)	73,9% (n=17/23)

Из данных, представленных в таблице, следует, что частота наступления беременности из расчета на перенос у пациенток I группы была выше в 1,7 раз по сравнению с женщинами II группы (29,6%) и в 1,4 раза по сравнению с III (35,9%) и составила 51,3%, однако разница не была статистически значимой ($p > 0,05$). Очевидно, в связи с малым объемом выборки, статистически значимое увеличение частоты высеваемости *G. vaginalis* и облигатно-анаэробных микроорганизмов в полости матки у женщин I группы не помешало наступлению беременности.

В работе проводилась терапия, направленная на восстановление микробиоты цервикального канала и полости матки у женщин, включенных в исследование. При обнаружении УПМ по данным культурального исследования отделяемого цервикального канала в умеренных (10^4 - 10^5 КОЕ/мл) концентрациях пациенткам назначали антибактериальное средство на основе геля с бактериофагами для интравагинального применения, если в цервикальном канале обнаруживались УПМ, идентичные видоспецифическим бактериофагам, входящим в его состав. Лечение проводили по следующей схеме: 5-7 мл геля 2 раза в день в течение 14 дней. При снижении общего количества лактобацилл (менее 10^5 КОЕ/мл) в цервикальных образцах назначались пробиотики в виде свечей вагинально в течение 10 дней. В случае выявления УПМ в высоких титрах

(10^6 КОЕ/ и более), а также при обнаружении УПМ, фаги которых не содержались в геле, препаратами выбора у женщин с отсутствием беременности была местная антибактериальная терапия (клиндамицин) в сочетании с пробиотиками.

Суммарно бактериофаготерапию получали 44/130 пациентки (33,8%), из которых 18 женщин (40,9%) с наступившей беременностью и 26 (59,1%) – с отсутствием. У 16 из 18 забеременевших женщин беременность завершилась родами (88,8%); неразвивающаяся беременность была у 1 женщины (5,6%); самопроизвольный выкидыш - у 1 (5,6%).

При обнаружении у пациенток УПМ в отделяемом из цервикального канала в концентрации 10^3 КОЕ/мл и менее лечение женщин не требовалось. У пациенток I группы без проводимого лечения частота наступления беременности на перенос эмбриона составила 47,8% (n=11), а частота своевременных родов - 63,6% (n=7/11). Так при отсутствии лечения у женщин с низкой степенью обсеменённости УПМ цервикального канала, частота наступления беременности была чуть ниже (47,8%) по сравнению с женщинами I группы, получавших терапию при обнаружении УПМ в умеренных концентрациях (56,3%) ($p > 0,05$). У женщин II группы с отсутствием лечения частота наступления беременности на перенос эмбриона была несколько меньше, чем у женщин, получавших лечение (35,7%) и составила 23,0% (n=3). Самопроизвольные роды были только у женщин 66,6% (n=2). У пациенток III группы частота наступления беременности достигла 32,5% (n=14), из которых своевременными родами завершилась беременность у 57,1% (n=8) пациенток. У 28,6% (4/14) была неразвивающаяся беременность, а у 14,2% (2/14) - самопроизвольный выкидыш.

Таким образом, лечение пациенткам необходимо проводить при обнаружении УПМ в умеренных и высоких титрах. Обнаружение УПМ в низких титрах (10^3 КОЕ/мл и менее) не является прогностическим фактором наступления беременности. При выявлении УПМ в умеренных титрах (10^4 КОЕ/мл и выше) очевидно, целесообразнее применять бактериофаги совместно с пробиотиками, которые могут оказывать благоприятное лечебное воздействие на микробиоту нижнего отдела репродуктивного тракта, учитывая отсутствие прерывания

беременности на ранних сроках у данных пациенток. При обнаружении УПМ в высоких концентрациях (10^6 КОЕ/мл и выше) целесообразно применение антибактериальной терапии совместно с пробиотиками.

На основании полученных данных разработан алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе при обнаружении УПМ на этапе прегравидарной подготовки (рисунок 11).

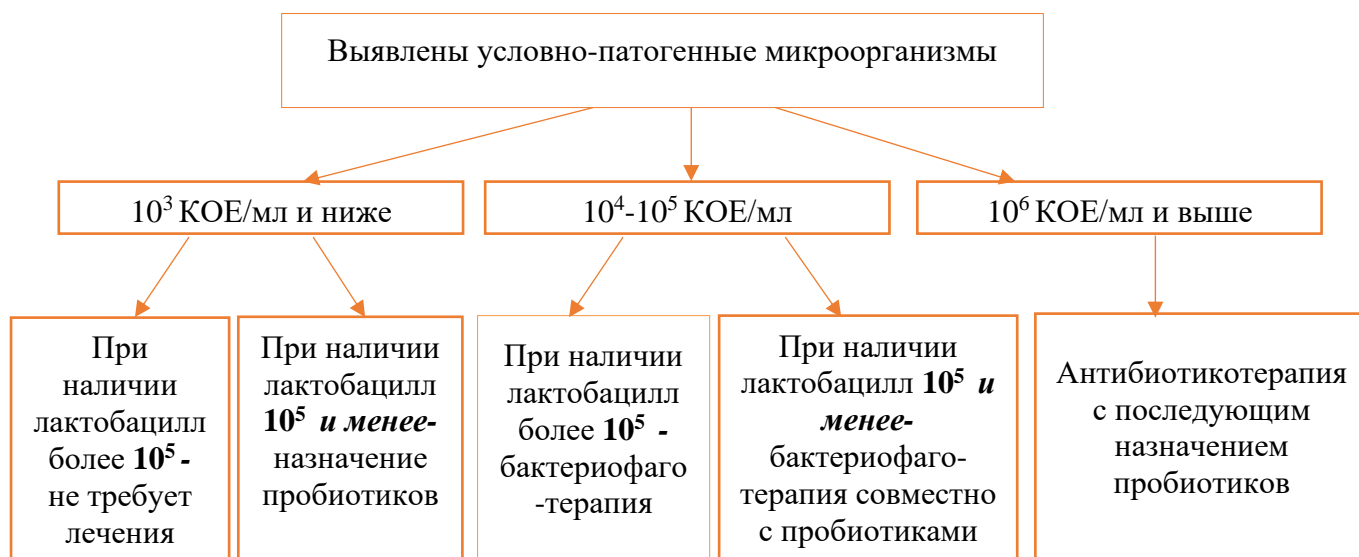


Рис. 11. Алгоритм ведения пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе при обнаружении УПМ на этапе прегравидарной подготовки

ВЫВОДЫ

1. Значимым фактором в прогнозировании шанса наступления беременности является наличие внутриматочных манипуляций в анамнезе. При селективном переносе эмбриона хорошего/отличного качества шанс наступления беременности у женщин с I попыткой ЭКО и отсутствием внутриматочных манипуляций выше в 3,4 раза по сравнению с пациентками с ПНИ и наличием двух и более манипуляций в анамнезе (95% ДИ:1,14- 10,5) при сопоставимых параметрах фолликулогенеза и раннего эмбриогенеза.

2. В видовом составе микроорганизмов полости матки у женщин с I попыткой ЭКО статистически значимо преобладали *G. vaginalis* и облигатно-анаэробные микроорганизмы по сравнению с пациентками с повторными

неудачами имплантации и переносом эмбриона в криоцикле ($p=0,05$; $0,02$). В видовом и количественном составе микробиоты цервикального канала не было обнаружено статистически значимого преобладания отдельных видов микроорганизмов.

3. Сравнительные данные о составе микробиоты полости матки и цервикального канала подтверждают концепцию о возможной нестерильности матки и существовании «самостоятельной» микробиоты, отличающейся от микробиоты нижних отделов репродуктивного тракта. Качественный состав и частота выделения различных видов микроорганизмов, обнаруженных в матке и цервикальном канале в общей когорте женщин, были идентичны только у 12,1% женщин, а у 87,9% - отличались.

4. Видовое разнообразие в полости матки у женщин с переносом эмбриона в цикле овариальной стимуляции было выше, чем у женщин с переносом эмбриона в криоцикле. У женщин с переносом эмбриона в криоцикле суммарно было обнаружено 35 видов микроорганизмов в полости матки (среднее количество видов на 1 женщину – 0,5). У пациенток с переносом эмбриона в циклах стимуляции суперовуляции было выделено 46 видов микроорганизмов (среднее количество видов на 1 женщину – 0,7).

5. У женщин как с наступившей беременностью, так и с ее отсутствием наиболее часто встречавшимися микроорганизмами в составе микробиоты полости матки были лактобациллы: в I группе соответственно 80,0% и 73,7%; во II группе - 90,2% и 79,0% и в III группе - 60,9% и 75,6%. Полученные данные не подтверждают гипотезу о роли лактобациллярной и нелактобациллярной микробиоты в генезе неудач имплантации эмбриона.

6. Частота выделения условно-патогенных микроорганизмов из полости матки и цервикального канала, а также количественный состав их выявления в цервикальном канале в умеренных концентрациях (до 10^5 КОЕ/мл) среди забеременевших и с отсутствием беременности женщин не имели статистически значимых отличий и не повлияли на исходы ВРТ у обследуемых групп.

7. У женщин с умеренно выраженными дисбиотическими нарушениями (10^4 - 10^5 КОЕ/мл), которым проводилась санация бактериофагами (n=44) частота наступления беременности составила 50%, родов – 88,8%. Применение бактериофагов может рассматриваться в качестве альтернативного способа коррекции дисбиотических нарушений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая снижение частоты наступления беременности у женщин с наличием внутриматочных манипуляций в анамнезе, следует четко обосновывать каждое «вхождение» в полость матки.

2. У пациенток с повторными неудачами имплантации на этапе прегравидарной подготовки целесообразно проведение исследования микробиоты полости матки методом культуромики с идентификацией выделенных микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) и определением чувствительности к антибиотикам, учитывая ее доступность и высокую информативность.

3. Учитывая, что метагеномное секвенирование не является достаточно специфичным для работы с образцами с крайне низкой концентрацией ДНК, его использование без негативных контрольных образцов для оценки микробиоты полости матки в момент переноса эмбриона является сомнительным.

4. В случае выявления дисбиотических нарушений в цервикальном канале, коррекцию микробиоты необходимо проводить при обнаружении УПМ в умеренных (10^4 - 10^5 КОЕ/мл) и высоких (10^6 и более КОЕ/мл) концентрациях.

5. При обнаружении условно-патогенных микроорганизмов в умеренных концентрациях целесообразно применение бактериофаготерапии, а при обнаружении условно-патогенных микроорганизмов в высоких концентрациях – использование антибактериальной терапии с последующим назначением пробиотиков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Микробиота полости матки и ее влияние на репродуктивные исходы / **Кебурия Л.К.**, Смольникова В.Ю., Припутневич Т.В., Муравьева В.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2019 - № 2 – С. 22-27
2. Особенности микробиоты эндометрия у женщин в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Кебурия Л.К.**, Смольникова В.Ю., Припутневич Т.В., Муравьева В.В. // Материалы I Национального конгресса с международным участием ЛАБРИН, Москва 2019
3. Влияет ли микробиота матки на неудачи ВРТ? / **Кебурия Л.К.**, Смольникова В.Ю., Припутневич Т.В., Муравьева В.В. // Материалы XXIX Международной конференции РАРЧ. Ростов-на Дону, 2019
4. Микробиота эндометрия и репродуктивный исход в программах вспомогательных репродуктивных технологий / **Кебурия Л.К.**, Смольникова В.Ю., Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология** – 2020 -№ 4 – С. 166-172
5. Микробиота полости матки и неудачи имплантации. Есть ли связь? / **Кебурия Л.К.**, Смольникова В.Ю., Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Трофимов Д.Ю., Шубина Е.С., Кочеткова Т.О. // **Акушерство и гинекология** – 2021- №7 – С.133-43
6. Influence of endometrial microbiota on reproductive outcomes in IVF programs / Smolnikova V.Yu, **Keburiya L.K.**, Priputnevich T.V., Muravieva V.S., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. // **American Journal of Biomedical Science & Research** – 2019-Vol. 4-№3 – P.197-200