

На правах рукописи

КИРИЛЛОВА

Екатерина Дмитриевна

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ С УЧЕТОМ
МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА**

3.1.4. Акушерство и гинекология

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва 2024

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 медицинских наук, профессор

Чернуха Галина Евгеньевна

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, доцент

Припутневич Татьяна Валерьевна

Официальные оппоненты:

Ярмолинская Мария Игоревна – профессор РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» Минобрнауки России, заведующий отделом гинекологии и эндокринологии;

Ильин Вячеслав Константинович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ ГНЦ РФ «Институт медико-биологических проблем Российской академии наук», заведующий отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания.

Ведущая организация:

ГБУЗ Московской области МОНИИАГ им. академика В.И. Краснопольского.

Защита диссертации состоится «16» апреля 2024 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика 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 имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России.

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Kirillova%20ED-disser.pdf?2054893802>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) – одна из наиболее распространенных форм гормонозависимых нарушений репродуктивной системы, частота которой составляет 10-13% [Teede H. et al., 2023].

СПКЯ характеризуется клинической и биохимической гиперандрогенией (ГА), поликистозной морфологией яичников и овуляторной дисфункцией, что приводит к олигоменорее, андрогензависимой дермопатии и ановуляторному бесплодию. У каждой 2-3й пациентки СПКЯ ассоциирован с метаболическими нарушениями в виде ожирения, инсулинорезистентности (ИР), гиперинсулинемии (ГИ), нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) и дислипидемии, которые являются факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета (СД) 2 типа [Tosi F. et al., 2017; Wekker V. et al., 2020]. В ряде исследований представлены данные о повышенной частоте метаболической дисфункции у пациенток с СПКЯ без ожирения, что стало предпосылкой к дискуссии о патогенезе ИР, а также о клинической значимости индекса массы тела (ИМТ) в диагностике избытка жировой ткани, ассоциированного с развитием метаболических нарушений [Moran L. et al., 2010; Morgan C. et al., 2012; Zhu S. et al., 2019].

В последние годы накапливаются данные о роли нарушений кишечной микробиоты (КМ) в развитии ожирения, СД 2 типа и метаболического синдрома (МС) [Esteve E. et al., 2011; Flint H. et al., 2011; Tremaroli V. et al., 2012]. Поскольку СПКЯ тесно связан с метаболическими нарушениями, не исключается роль нарушений КМ в его генезе. Согласно теории DOGMA (Dysbiosis of Gut Microbiota), дисбиоз может провоцировать ИР, гиперпродукцию андрогенов и нарушение фолликулогенеза посредством активации иммунной системы в ответ на хроническое субклиническое воспаление [Tremellen K. et al., 2012]. Ключевым звеном данной концепции является нарушение баланса микроорганизмов, поддерживающих гомеостаз кишечника и колонизационную резистентность. Считается, что чрезмерная пролиферация условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) увеличивает проницаемость кишечной стенки, способствуя выходу

бактериального эндотоксина грамотрицательных бактерий – липополисахарида (ЛПС) – в системный кровоток и развитию эндотоксемии, которая может вызывать активацию клеточного иммунитета, индукцию синтеза провоспалительных цитокинов (ФНО альфа, IL-6) адипоцитами, приводя к хроническому субклиническому воспалению и формированию ИР на пострецепторном уровне [Tremellen K. et al., 2012]

В литературе есть указание на снижение биологического разнообразия бактериального состава кишечника при СПКЯ, которое ассоциировано с гиперандрогенией и метаболическими нарушениями [Lindheim L. et al., 2017; Zhang F. et al., 2019], а также показано взаимное влияние микробиоты и андрогенов друг на друга [Insenser M. et al., 2018; Sherman S. et al., 2018]. Однако к настоящему времени имеется ограниченное число исследований по изучению состава КМ у пациенток с СПКЯ, а их результаты достаточно противоречивы.

Взаимосвязь ИР и ГА с кишечной микробиотой может служить основой для оптимизации принципов терапии СПКЯ, выбор которой в настоящее время определяется жалобами пациенток, преимущественно направлен на устранение проявлений ГА, регуляцию менструального цикла, индукцию овуляции и в меньшей степени на коррекцию метаболических нарушений. С этой целью применяются инсулиносенситайзеры, в частности метформин, однако регуляция цикла на его фоне происходит лишь в половине случаев. В литературе имеются данные о положительном эффекте метформина у больных с СД 2 типа на разнообразие и баланс кишечных микроорганизмов в виде увеличения количества симбионтных бактерий родов *Roseburia* spp., *Subdoligranulum* spp., *Phascolarctobacterium* spp., *Intestinimonas* spp. и порядка *Clostridiales* [Forslund K. et al., 2015; Huang Y. et al., 2022]. Исследования по изучению эффекта метформина на КМ пациенток с СПКЯ единичны и не дают однозначного понимания о его влиянии на количественный и качественный состав микроорганизмов в кишечнике [Gan J. et al., 2023]. Проводятся попытки коррекции эндокринно-метаболических нарушений при СПКЯ путем модуляции КМ пробиотиками. Представлены данные как о положительном влиянии такого подхода, так и о его отсутствии. [Heshmati J.

et al., 2019; Mu J. et al., 2023; Zhang F. et al., 2019]. Перспективным направлением является изучение влияния трансплантации кишечной микробиоты (ТКМ) на количество жировой ткани и ИР, что было показано в недавних исследованиях на мышах и человеке [Proença I. et al., 2020; Wang H. et al., 2019; Wu Y. et al., 2022].

Все вышеизложенное обосновывает целесообразность дальнейшего изучения эндокринно-метаболических особенностей пациенток с СПКЯ с учетом композиционного состава тела и КМ для поиска возможных путей повышения эффективности терапии.

Степень разработанности темы исследования

Проведенные к настоящему времени исследования указывают на ассоциацию СПКЯ с нарушениями микробиоты кишечника, однако данные об участии конкретных микроорганизмов или их групп в патогенезе СПКЯ разноречивы [Kelley S. et al., 2016; Qi X. et al., 2019; Torres P. et al., 2018]. Исследования в данном направлении, проведенные на когорте российских женщин с СПКЯ, отсутствуют.

К настоящему времени имеется достаточное количество данных о наличии метаболической дисфункции у пациенток с СПКЯ, однако остаются малоизученными причины формирования этих нарушений у пациенток с нормальным индексом массы тела [Carmina E. et al., 2007; Durmus U. 2017; Ezeh U. et al., 2014; Glueck C. et al., 2019; Kirchengast S. et al., 2004; Puder J. et al., 2005]. Не определена значимость композиционного состава тела в генезе метаболической дисфункции, что служит поводом для поиска предикторов метаболических нарушений у пациенток с СПКЯ при нормальном ИМТ.

С целью коррекции инсулинорезистентности и ассоциированной с ней ГА пациенткам с СПКЯ назначается терапия метформином. Однако предикторы ее эффективности не определены, как и влияние на КМ, что обосновывает целесообразность поиска клинических, биохимических, иммунологических, а возможно, и микробиологических маркеров успешности терапии.

Цель исследования

Оптимизация тактики ведения пациенток с СПКЯ на основе изучения особенностей кишечной микробиоты и ее связи с эндокринно-метаболическими нарушениями и маркерами хронического воспаления.

Задачи исследования

1. Проанализировать композиционный состав тела, концентрацию лептина и адипонектина у пациенток с СПКЯ.
2. Оценить концентрацию провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α) и СРБ в сыворотке больных с СПКЯ.
3. Определить взаимосвязь андрогенного и метаболического профиля с маркерами хронического воспаления у пациенток с СПКЯ.
4. Изучить состав микробиоты кишечника у пациенток с СПКЯ с учётом гормонального профиля и метаболических нарушений.
5. Провести сравнительный анализ эффективности метформина и его комбинации с пробиотиком на состав кишечной микробиоты, эндокринно-метаболические параметры и характер менструального цикла пациенток с СПКЯ.

Научная новизна исследования

В ходе комплексного клинико-лабораторного исследования определена частота и характер метаболических нарушений у пациенток с СПКЯ, имеющих нормальную массу тела. Изучение композиционного состава тела у данной когорты больных позволило выявить высокую частоту избытка жировой ткани, до 4-х раз увеличивающего риск метаболической дисфункции и до 9-ти раз – хронического субклинического воспаления.

На популяции российских женщин изучены особенности кишечной микробиоты при СПКЯ, описаны изменения ее состава, включая снижение видового богатства и нарушение баланса микробных сообществ в виде снижения численности симбионтных бактерий (*Clostridium leptum* gr., отдельных видов

Lactobacillus, *Bifidobacterium* и *Bacteroides* spp.) и повышении популяции условно-патогенных видов *Clostridium* и *Staphylococcus* spp. Определена взаимосвязь нарушений КМ с избытком жировой ткани, повышением маркеров хронического субклинического воспаления и ИР.

Наряду с положительным эффектом терапии метформином на эндокринно-метаболические параметры и композиционный состав тела, установлено его влияние на кишечную микробиоту в виде увеличения численности симбионта *Akkermansia muciniphila* и снижения условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus* и видов *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*. Определены микробиологические предикторы эффективности терапии метформином, создана модель, позволяющая прогнозировать восстановление ритма менструаций на основе исходного уровня АМГ и количества симбионтных бактерий *Clostridium leptum* gr.

Научно обоснован поиск новых методов коррекции КМ у пациенток с СПКЯ, направленных на увеличение колонизационных показателей симбионтных микроорганизмов группы *Clostridium leptum* и *Akkermansia muciniphila*.

Практическая значимость полученных результатов

На основании полученных результатов усовершенствован алгоритм обследования пациенток с СПКЯ, включающий комплексную оценку метаболического профиля, композиционного состава тела с определением процентного содержания общей и висцеральной жировой ткани, ассоциированной с повышением маркеров хронического субклинического воспаления. Определены пороговые значения ИМТ для прогнозирования метаболических нарушений и избытка жировой ткани у пациенток с СПКЯ при нормальной массе тела. Разработана модель прогнозирования эффективности терапии метформином, включающая уровень АМГ и численность бактерий *Clostridium leptum* gr.

Положения, выносимые на защиту

1. Для пациенток с СПКЯ, имеющих нормальный ИМТ, независимо от фенотипа синдрома, характерен избыток жировой ткани, в каждом 3-ем случае ассоциированный с гиперинсулинемией, инсулинорезистентностью, дислипидемией, в каждом 5-ом – с нарушением толерантности к глюкозе и в четверти случаев – с признаками хронического субклинического воспаления, сопряженного с избытком висцеральной жировой ткани.
2. Кишечная микробиота при СПКЯ характеризуется снижением видового богатства и изменением баланса микробных сообществ, что наиболее выражено в снижении численности симбионтных видов *Clostridium*, *Bacteroides* spp. и ряда других бактерий, обеспечивающих колонизационную резистентность кишечника, а также в повышении популяции условно-патогенных видов *Clostridium* и *Staphylococcus* spp., продуцирующих экзотоксины, ассоциированные с хроническим субклиническим воспалением, избытком жировой ткани и формированием инсулинорезистентности.
3. Исходный уровень АМГ $\leq 12,7$ нг/мл и высокий уровень колонизации кишечника симбионтными бактериями группы *Clostridium leptum* (более 10^9 ГЭ/г) могут служить предикторами эффективности терапии метформином, сопряженной с улучшением состава кишечной микробиоты, коррекцией гиперинсулинемии, гиперандрогении и регуляцией ритма менструаций; комбинация метформина с пробиотиком не оказывает дополнительного положительного эффекта.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в выборе научного направления, разработке дизайна и концепции исследования, формулировке цели и задач, провел обзор современной научной литературы, выполнил сбор образцов биологического материала, принимал участие в ведении пациенток на всех этапах их обследования и лечения. Автором проведены статистический анализ и

систематизация полученных результатов, подготовка материалов к публикациям и защите диссертации.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность данных исследования подтверждается объемом выборки пациенток, включенных в исследование (n=300), а также результатами статистической обработки данных.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология, 1.5.11. Микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальностей, конкретно пунктам 1, 4 и 5 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология и пунктам 9 и 10 паспорта специальности 1.5.11. Микробиология.

Апробация диссертации

Диссертационная работа обсуждена на межклинической конференции (13.07.2022) и на заседании апробационной комиссии ФБГУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (20.11.2023, протокол №13). Результаты работы представлены на XXII Всероссийском научном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 29 сентября – 1 октября 2021 года), Российском научно-практическом конгрессе "Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте: проблемы и решения" (Москва, 11–13 ноября 2021 года, 16–18 ноября 2023 года), XVI Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 18–21 января 2022 года), XXIX Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 29–31 марта 2023 года), II Всероссийском конгрессе «Право на жизнь» (Москва, 20-21 апреля 2023 года), IX Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 4-6 октября 2023 г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанные рекомендации по обследованию и ведению пациенток с СПКЯ внедрены и используются в практической деятельности отделения гинекологической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский

исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы диссертации используются для подготовки материалов лекций, конгрессов.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах печатного текста, состоит из введения, пяти глав, посвященных описанию материалов и методов исследования, полученным результатам и их обсуждению, а также выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 31 рисунком и 20 таблицами. Библиография содержит 204 источника литературы, в том числе 9 отечественных и 195 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В основу работы положены результаты клинико-лабораторного обследования 300 женщин, обратившихся в отделение гинекологической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова Минздрава России» с января 2019 по декабрь 2022 гг. Основную группу составили 270 пациенток с СПКЯ (средний возраст – $25,9 \pm 5,5$ лет, средний ИМТ – $24,1 \pm 5,0$ кг/м²). Диагноз СПКЯ устанавливался согласно рекомендациям Международного симпозиума объединенной рабочей группы Европейского общества репродукции и эмбриологии человека и Американского общества репродуктивной медицины [Минздрав России, 2021]. Группу сравнения составили 30 женщин репродуктивного возраста (средний возраст – $26,6 \pm 5,0$ лет, средний ИМТ – $24,4 \pm 4,8$ кг/м²) с регулярным менструальным циклом, без гормонально-ассоциированных нарушений функции репродуктивной системы, гастроэнтерологических

заболеваний, хронических воспалительных некомпенсированных заболеваний различной локализации и этиологии, острых воспалительных заболеваний.

Клинико-лабораторное обследование включало оценку гормонального профиля на 2-3 день спонтанного или индуцированного приемом прогестагенов менструального цикла. Были определены сывороточные уровни АМГ, ЛГ, ФСГ, эстрадиола, общего и свободного тестостерона, андростендиона, протеина, связывающего стероидные гормоны (ПССГ), 17-ОП, пролактина и ТТГ, а также лептина, адипонектина, IL-1, IL-6 и TNF- α и СРБ. Ультразвуковое исследование органов малого таза проводилось трансвагинальным датчиком частотой 8,0 МГц с определением объема яичников, подсчетом числа антральных фолликулов в объеме яичников в 3D-режиме (аппарат Toshiba SSA-240, Япония). Всем пациенткам был проведен пероральный 2-х часовой глюкозотолерантный тест (ПГТТ) с 75 г глюкозы с оценкой уровня глюкозы и иммунореактивного инсулина натощак, через 1 и 2 часа после нагрузки, а также оценка липидного спектра крови (общий холестерин, триглицериды, липопротеиды высокой плотности, липопротеиды низкой плотности, расчет коэффициента атерогенности). Композиционный состав тела, включающий количество и характер распределения жировой ткани, а также объем и массу висцеральной жировой ткани, определялся методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат фирмы «Lunar» (США)).

Оценка состава кишечной микробиоты проводилась двумя способами. Метод культуромики включал использование расширенного спектра питательных сред, метода MALDI-TOF масс-спектрометрии и проведение таксономического анализа путем секвенирования последовательности гена 16S рибосомальных РНК методом Сэнгера.

Метод ПЦР в режиме реального времени проводился в препаратах ДНК, полученных из образцов кала исследуемых женщин с использованием набора реагентов (тест-система) Энтерофлор®-дети (НПО ДНК-Технология, Россия)

Статистическая обработка данных проводилась с помощью таблиц «Microsoft Excel» и программы «MedCalc» (MedCalc® statistical software, версия 22.013). Для количественных показателей рассчитаны: среднее значение, среднеквадратическое отклонение, медиана, интерквартильный размах. Для качественных и порядковых показателей - частоты. Сравнение производилось с помощью t-критерия Стьюдента и критерия χ^2 Пирсона. Проведены ROC-анализ и регрессионный анализ с целью определения комплекса факторов, определяющих эффективность терапии метформина и их пороговых значений. Для оценки видового богатства рассчитывался индекс Маргалефа по формуле $D_{Mg}=(S-1)/\ln N$, где S - число выявленных видов и N - общее число особей всех S видов. Корреляционный анализ проводился с помощью метода Пирсона (для нормально распределенных параметров). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди 270 пациенток с СПКЯ у 43 (16,0%) выявлено ожирение, у 50 (18,5%) – избыточная масса тела, соответственно, большинство – 177/270 (65,5%) – имели нормальный ИМТ. Оценка композиционного состава тела показала, что у 105/177 (59,3%) из них имеется избыток жировой ткани, свидетельствующий о «скрытом ожирении» (рис. 1).

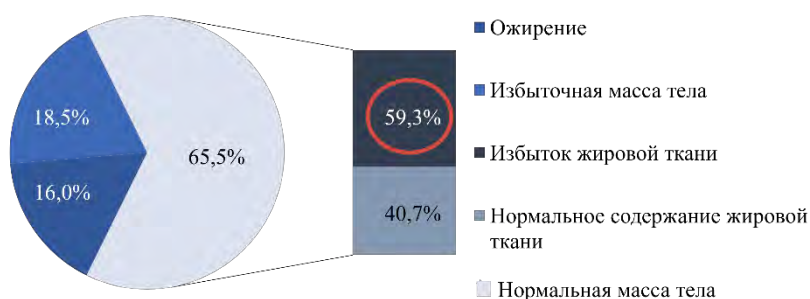


Рисунок 1. Распределение пациенток с СПКЯ в соответствии с ИМТ и процентным содержанием жировой ткани

Еще в 1981 г. Ruderman и соавторы выявили когорту пациентов с обменными нарушениями при нормальном ИМТ и предложили термин «метаболическое ожирение при нормальном весе» (metabolically obese normal weight). Критериев

диагностики данного состояния до настоящего времени нет, но большинство таких пациентов имеют ИР и избыток жировой ткани.

В проведенном исследовании пациентки со «скрытым ожирением» в 57/105 (54,3%) случаев имели повышенное количество метаболически неблагоприятной висцеральной жировой ткани. Кроме этого, у 39/105 (37,1%) из них была диагностирована ГИ, у 30/105 (28,6%) – ИР и дислипидемия, у 17/105 (16,2%) – НТГ. Эти показатели были значимо выше, чем в группе с нормальным содержанием жировой ткани, и достоверно не отличались от таковых у пациенток с избыточной массой тела (рис. 2). Это подтверждает преимущества денситометрии с оценкой композиционного состава тела по сравнению с расчетом ИМТ для прогнозирования метаболических нарушений.

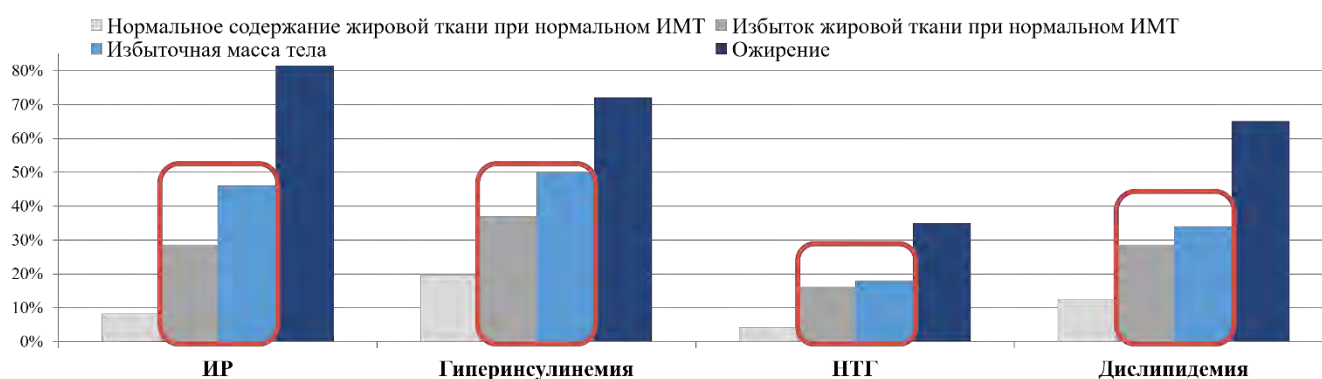


Рисунок 2. Частота метаболических нарушений при СПКЯ в зависимости от ИМТ и количества общей жировой ткани.

Учитывая ограниченные возможности использования денситометрии в широкой клинической практике, был проведен ROC-анализ для определения порогового значения ИМТ с целью предикции избытка жировой ткани и метаболических нарушений. При ИМТ >23 кг/м² (AUC=0,837, чувствительность 87,4%, специфичность 69,7%) у всех больных был диагностирован избыток общей жировой ткани, ИР отмечалась в 3 раза чаще, ГИ и дислипидемия – в 2 раза, а НТГ – в 6,5 раз чаще, чем при ИМТ ≤ 23 кг/м² (таблица 1). Это свидетельствует о возможности использования ИМТ 23 кг/м² в качестве порогового значения для диагностики избытка жировой ткани и ассоциированных с ним метаболических

нарушений у пациенток с СПКЯ при невозможности оценки композиционного состава тела методом денситометрии.

Таблица 1. Частота выявления избытка жировой ткани и метаболических нарушений в зависимости от нового порогового значения ИМТ (23 кг/м²).

Показатели	ИМТ 18-23 (N=127)	ИМТ 23,1-24,9 (N=50)	p-value
Избыток жировой ткани, %	44,1%	100,0%	<0,001
Висцеральное ожирение, %	13,4%	66,0%	<0,001
ИР, %	12,9%	52,0%	<0,001
Гиперинсулинемия, %	22,8%	52,0%	0,003
НТГ, %	6,3%	22,0%	<0,001
Дислипидемия, %	21,3%	34,0%	0,003

Помимо метаболической дисфункции, имеются данные о косвенных признаках хронического субклинического воспаления (ХСВ) у пациенток с СПКЯ в виде умеренного повышения уровней провоспалительных цитокинов и СРБ [Escobar-Morreale H. et al., 2011; Kelly S. et al., 2001]. Однако, если взаимосвязь воспаления с ожирением подтверждена, то повышение провоспалительных маркеров при нормальной массе тела, остается предметом дискуссий. Оценка уровней провоспалительных цитокинов в общей группе пациенток с СПКЯ выявила более высокое содержание IL-6 и TNF- α в сыворотке крови по сравнению со здоровыми женщинами. Признаки ХСВ проявлялись также в виде умеренного повышения уровня СРБ (5-10 мг/л), которое было диагностировано не только у каждой 3-й пациентки с ожирением, но и у каждой 4-й с избыточной массой тела, а также с избытком жировой ткани и нормальным ИМТ. При нормальной массе тела и нормальном количестве жировой ткани повышенный СРБ был выявлен только в 1 (3,5%) случае (рис. 3).



Рисунок 3. Частота повышения СРБ в зависимости от ИМТ и количества общей жировой ткани.

Установлена прямая взаимосвязь уровней IL-6 и СРБ в сыворотке крови с показателями композиционного состава тела. Наиболее сильная корреляция была обнаружена с процентом общей жировой ткани ($r=0,5$, $p<0,001$, $r=0,7$, $p<0,001$), а также с массой висцеральной жировой ткани ($r=0,5$, $p<0,001$, $r=0,6$, $p<0,001$). Это подтверждает теорию «метаболического воспаления», которое возникает вследствие гипертрофии адипоцитов и накопления в жировой ткани иммунных клеток, секретирующих провоспалительные цитокины, у пациентов с избытком жировой ткани [Aboeldalyl S. et al., 2021]. Таким образом, избыток жировой ткани может усугублять течение СПКЯ.

Несмотря на то, что некоторые исследователи связывают наличие ХСВ с ГА [Aboeldalyl S. et al., 2021], в данной работе не выявлена взаимосвязь провоспалительных цитокинов и СРБ с андрогенным профилем, как и не обнаружено существенных отличий по частоте метаболических нарушений и избытка жировой ткани между различными репродуктивными фенотипами синдрома, что может свидетельствовать об их недостаточном клиническом значении.

Дополнительным фактором развития ХСВ может служить иммунный ответ организма на попадание в системный кровоток кишечных энтеротоксинов вследствие дисбиоза кишечной микробиоты и повышения проницаемости

кишечной стенки, о чем свидетельствуют исследования КМ у пациенток с СПКЯ [Gan J. et al., 2023; Liu R. et al., 2017; Mukherjee A. et al., 2023; Qi X. et al., 2019].

Анализ состава кишечной микробиоты методом культуромики, проведенный у 140 пациенток с СПКЯ (ср. возраст $25,2 \pm 5,6$, ср. ИМТ $24,2 \pm 5,1$) и 30 здоровых женщин позволил идентифицировать микроорганизмы 51 семейства, 80 родов и 320 видов, которые принадлежали в основном к 4-м типам, наиболее часто представленным в кишечнике человека. Соотношение самых многочисленных из них – *Firmicutes* и *Bacteroidetes* при СПКЯ было смещено в сторону первых, в основном за счет увеличения численности УПМ родов *Streptococcus* и *Enterococcus*. Наиболее многочисленные таксоны представлены на рисунке 4.

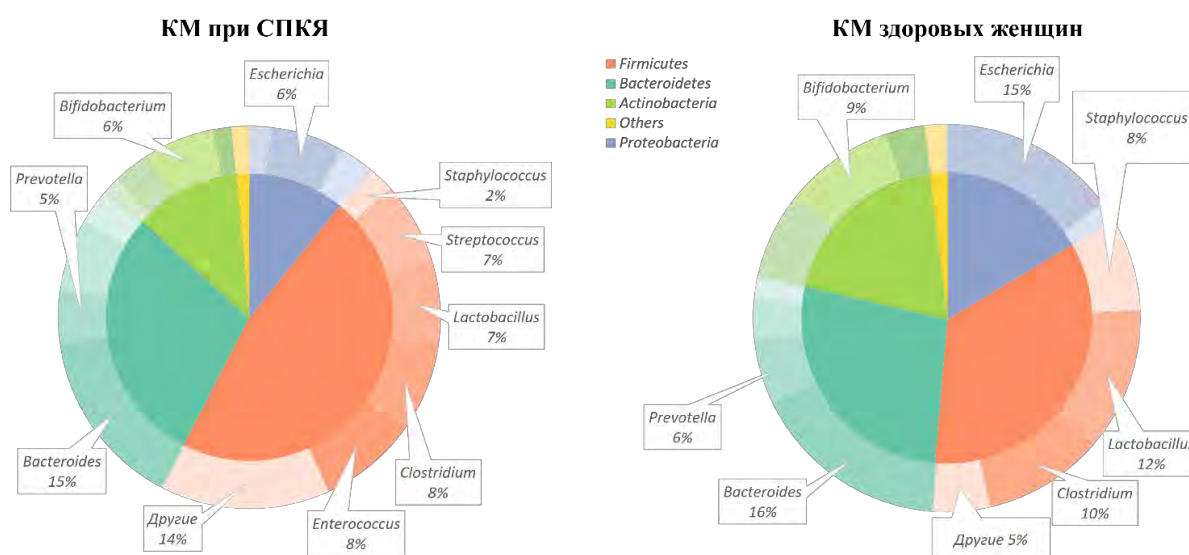


Рисунок 4. Состав КМ в группах СПКЯ и сравнения

Одним из наиболее значимых показателей стабильности и колонизационной резистентности КМ является ее биологическое разнообразие, включая видовое богатство, то есть количество разных видов микроорганизмов в определенном образце, которое было снижено у пациенток с СПКЯ по сравнению со здоровыми женщинами, на что указывает значение индекса Маргалефа. Наиболее низкие показатели отмечены у пациенток с избыточной массой тела и особенно с ожирением, что отражает дополнительное негативное влияние жировой ткани на КМ (рис. 5).

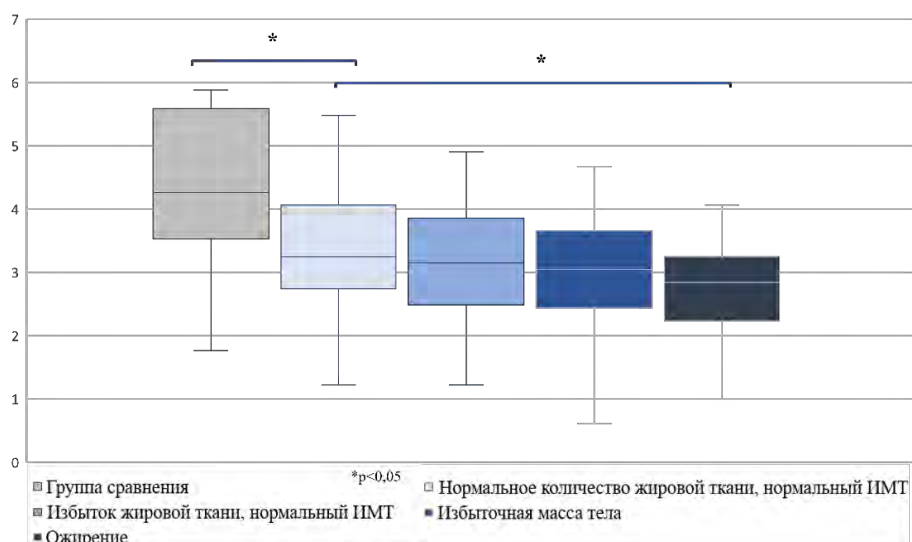


Рисунок 5. Индекс видового богатства Маргалефа в группах сравнения и СПКЯ в зависимости от ИМТ и количества жировой ткани

Количественный анализ бактериального состава кишечника пациенток с СПКЯ выявил нарушение баланса микробных сообществ в виде повышения титра условных патогенов *Staphylococcus aureus* и *Erysipelatoclostridium ramosum* (рис. 6), ассоциированных с продукцией токсинов и повышенной абсорбцией липидов в кишечнике. Наряду с этим, обнаружено значительное снижение численности бактерий из группы симбионтов, продуцирующих полезные короткоцепочечные жирные кислоты и поддерживающих гомеостаз кишечника: *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacteroides eggerthii* и *Bacteroides vulgatus* (рис. 6).

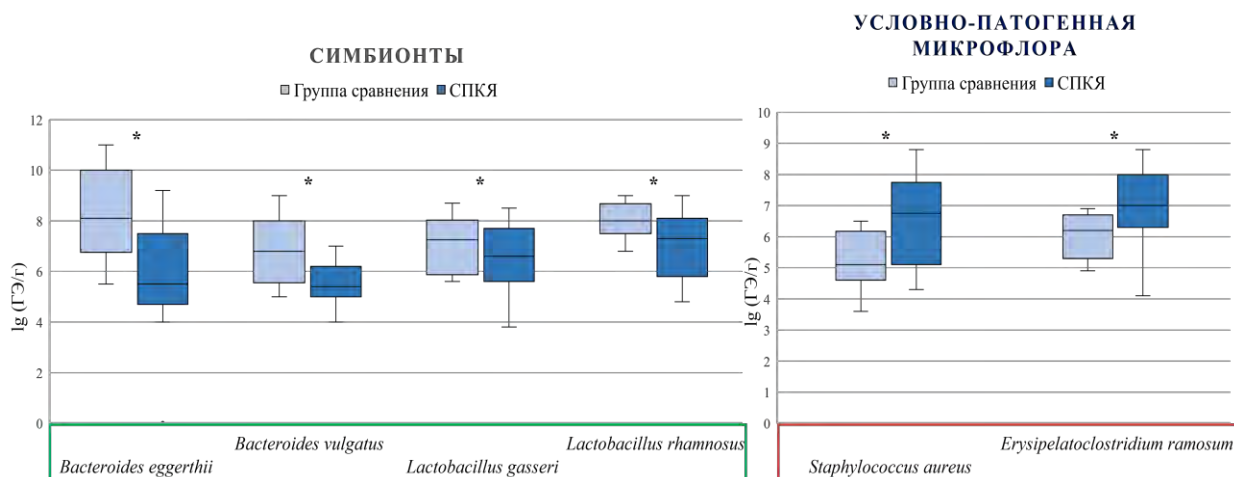


Рисунок 6. Титр представителей симбионтных и условно-патогенных микроорганизмов при СПКЯ и в группе сравнения (*p<0,05).

С целью количественной оценки отдельных групп труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий был проведен анализ КМ методом ПЦР. Дополнительно выявлено снижение численности бактерий рода *Prevotella* и группы *Clostridium leptum* (*C. leptum*) (в т.ч. *Faecalibacterium prausnitzii*), а также тенденция к снижению количества *Akkermansia muciniphila*, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты. Помимо этого, при СПКЯ отмечены более высокие титры УПМ группы *Clostridium perfringens* (рис. 7).

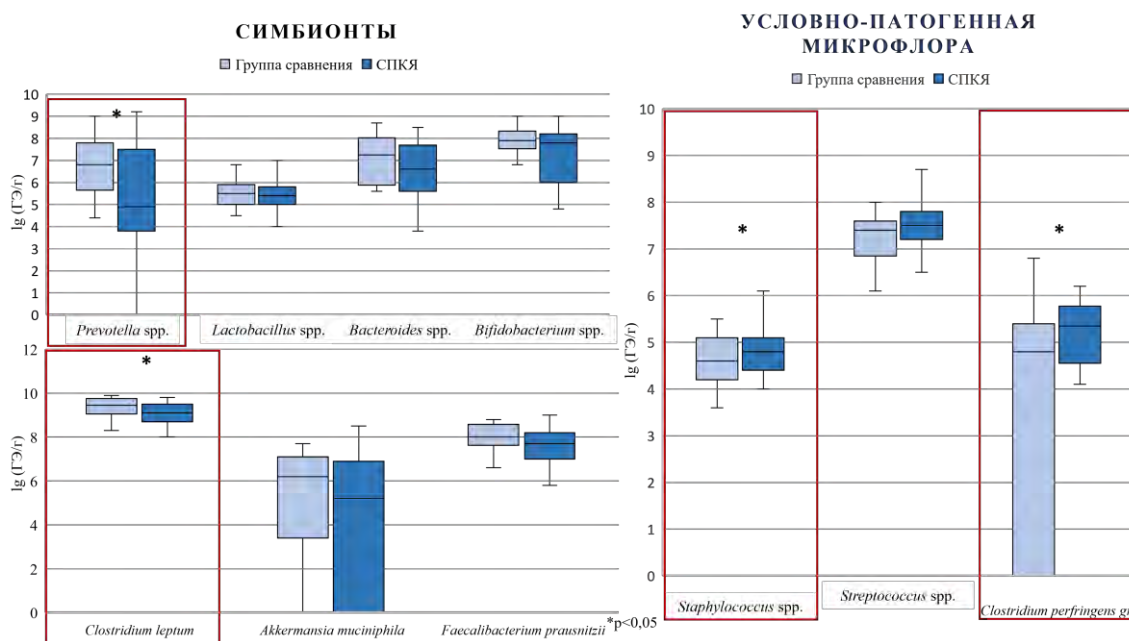


Рисунок 7. Титр представителей симбионтных и условно-патогенных микроорганизмов при СПКЯ и в группе сравнения (* $p < 0,05$).

При разделении пациенток на группы в зависимости от ИМТ отмечено усугубление дисбаланса КМ в группе с ожирением по сравнению с нормальной массой тела. При избыточной массе тела по сравнению с нормальным ИМТ отмечалась тенденция к снижению количества бактерий группы *C. leptum* ($8,8 \pm 0,6$ и $9,0 \pm 0,5$ соответственно, $p = 0,524$) и рода *Bifidobacterium* ($7,2 \pm 1,4$ и $8,1 \pm 0,8$ соответственно, $p = 0,599$), которая достигла статистической значимости при ожирении по сравнению с пациентками с нормальным ИМТ ($9,0 \pm 0,5$ и $8,3 \pm 1,0$, $p = 0,0195$ и $6,8 \pm 2,5$ и $8,1 \pm 0,8$, $p = 0,016$ соответственно). Среди УПМ не выявлено отличий между пациентками с нормальной и избыточной массой тела по количеству бактерий рода *Staphylococcus*, тогда как при ожирении их количество

статистически значимо превышало таковое у пациенток с нормальным ИМТ ($4,7 \pm 1,6$ и $5,9 \pm 1,7$, $p=0,015$ соответственно).

При проведении корреляционного анализа установлена отрицательная связь симбионтов (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Bacteroides* spp.) с маркерами хронического субклинического воспаления ($r=-0,3$, $p=0,026$, $r=-0,4$, $p=0,001$ и $r=-0,3$, $p=0,006$ соответственно). Выявлена положительная связь между *Erysipelatoclostridium ramosum* и IL-6 ($r=0,3$, $p=0,023$), что указывает на тесную взаимосвязь нарушений КМ с развитием ХСВ и подтверждает выдвинутую Tremellen K. et al. (2012) теорию о дисбиозе КМ, который провоцирует ХСВ, что способствует формированию инсулинорезистентности, ассоциированной с яичниковой гиперандрогенией.

С целью коррекции эндокринно-метаболических нарушений 130 пациенткам с СПКЯ (средний возраст – $25,47 \pm 5,42$ года, средний ИМТ – $25,82 \pm 5,33$ кг/м²), не заинтересованным в контрацепции, проведен 6-месячный курс терапии метформином (1500 мг/сут). Учитывая выявленные дисбиотические нарушения кишечной микрофлоры при СПКЯ, изучалось влияние метформина и его комбинации с пробиотиком на состав КМ и эндокринно-метаболические параметры. С этой целью 30 пациенткам в течение 3х месяцев проводилась комбинированная терапия с дополнительным назначением пробиотика (на основе 14 видов молочнокислых бактерий и *Bifidobacterium* spp.). Исследование завершили 92 пациентки, получавшие монотерапию метформином и 24 пациентки, принимавшие комбинацию метформина с пробиотиком.

После 6 месяцев монотерапии метформином отмечена положительная динамика гормональных параметров в виде снижения уровня ЛГ на 22,9%, андростендиона – на 33,5% и общего тестостерона – на 21,4%, повышения ПССГ – на 29,4%. Наряду с этим отмечалась коррекция метаболической дисфункции в виде снижения уровня инсулина натощак и индекса НОМА на 29,0% и частоты ИР на 38%. На этом фоне наблюдалась тенденция к снижению маркеров хронического субклинического воспаления: количество пациенток с повышенным уровнем СРБ сократилось в 1,5 раза, с повышением IL-6 – в 3,5 раза. Средние показатели ИМТ

существенно не изменились, однако наблюдалась положительная динамика показателей композиционного состава тела. Так, например, процент общей жировой ткани снизился с $37,0 \pm 7,3\%$ до $35,4 \pm 6,6\%$, $p < 0,001$, масса висцеральной жировой ткани – с $654,4 \pm 651,7$ до $382,5 \pm 416,2$ г, $p = 0,001$. Однако это не оказало существенного влияния на распределение пациенток по группам в зависимости от ИМТ и композиционного состава тела, поскольку метформин не относится к категории лекарственных средств, одобренных для лечения ожирения.

Клинический эффект в виде увеличения числа менструаций был отмечен уже через 3 месяца, через 6 месяцев терапии полный эффект в виде регуляции менструального цикла был достигнут у 50/92 (54,4%) пациенток, частичный – у 14/92 (15,2%), у 28/92 (30,4%) сохранялась олигоменорея.

Анализ состава КМ показал, что при полном эффекте терапии происходит значительное снижение количества УПМ рода *Staphylococcus* и видов *C. perfringens* и *C. difficile* на фоне увеличения симбионта *Akkermansia muciniphila* на 40%. При отсутствии эффекта не удалось выявить значимого снижения количества условных патогенов, титр *A. muciniphila* повысился лишь на 10,2%.

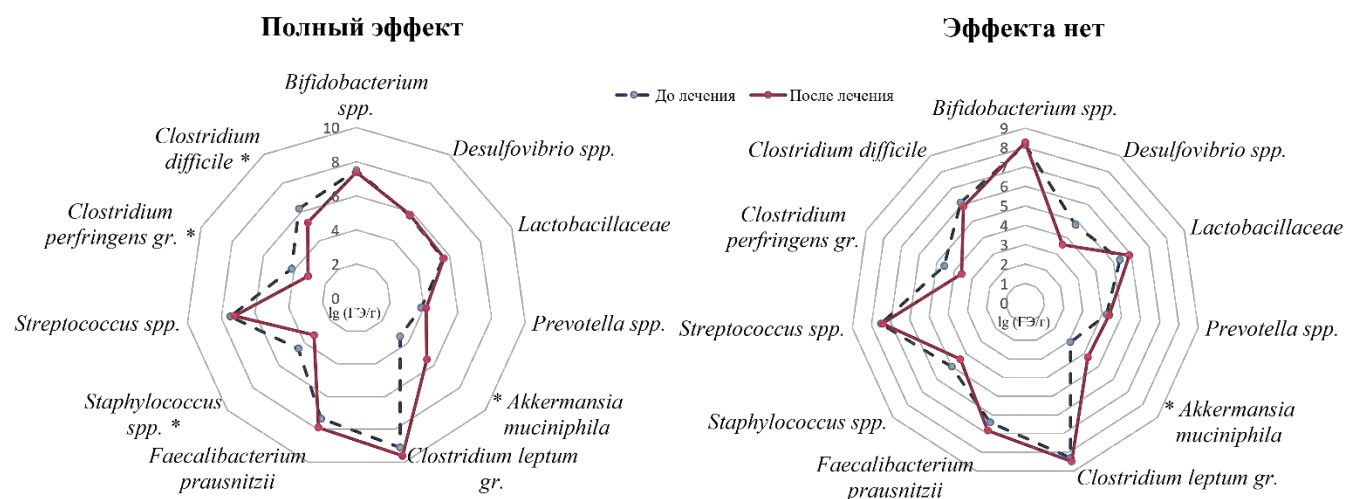


Рисунок 8. Сравнительный анализ бактериального состава микробиоты кишечника у пациенток с полным эффектом терапии и без эффекта

С целью поиска возможных предикторов эффективности терапии метформином проанализированы исходные эндокринно-метаболические

параметры и состав КМ. Различия обнаружены по уровню АМГ и численности симбионтных бактерий *C. leptum*, *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. На основании полученных результатов разработана модель для прогнозирования эффективности терапии метформином при СПКЯ. Уровень АМГ и численность группы бактерий *Clostridium leptum* могут рассматриваться как факторы, определяющие успешность терапии. Методом логистической регрессии рассчитанная на основе уровня АМГ в сыворотке крови и титра *Clostridium leptum gr.*, выявлена переменная, характеризующая вероятность регуляции менструального цикла на фоне терапии метформином.

Классифицирующая дискриминантная функция имеет вид:

$$Z = 0,045 * АМГ + 3,185 * Clostridium leptum gr. - 28,463, где$$

28,463 – константа

Clostridium leptum gr. – количество lg (ГЭ/г) микроорганизмов *Clostridium leptum gr.*, выявленных в кале методом ПЦР до терапии.

АМГ – уровень АМГ в сыворотке крови до терапии (нг/мл).

Вероятность регуляции ритма менструаций на фоне терапии метформином (p) определялась по формуле $p=1/(1+e^{-z})$. При значении p больше 0,5 можно предположить полный эффект от терапии метформином, а при значении p меньше 0,5 успешность терапии маловероятна.

Точность прогнозирования эффективности терапии СПКЯ метформином с использованием вышеприведенных независимых переменных составляет 60,5%. Был проведен *ROC*-анализ для валидации полученной модели. Чувствительность составила 84% (69-93%), специфичность - 68% (48-84%), значение *AUC* (площадь под кривой) для данной модели составляет 0,85, 95 % доверительный интервал от 0,764 до 0,895 ($p=10^{-14}$) (рис. 9).

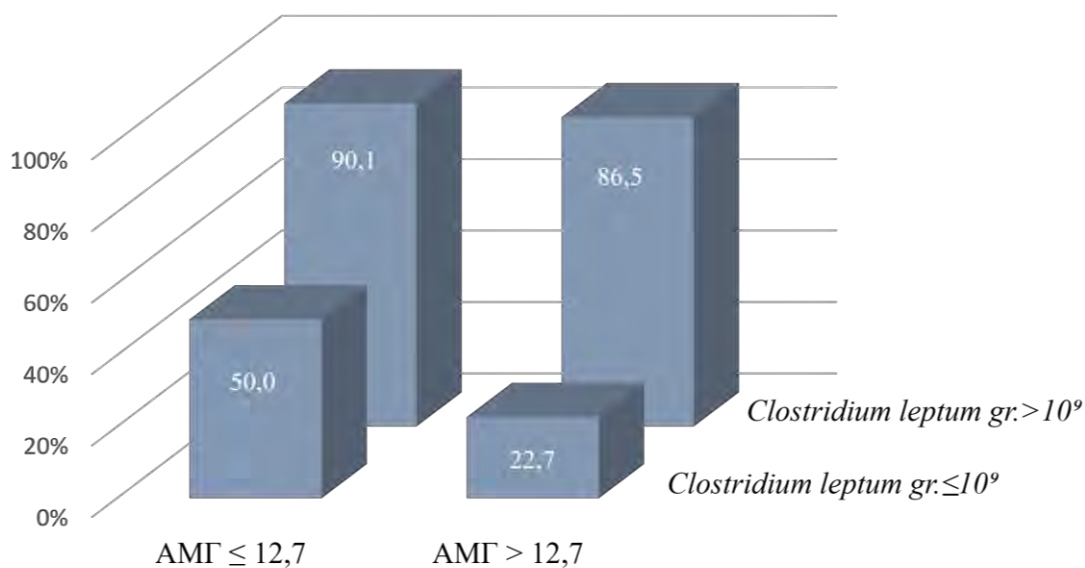


Рисунок 9. Вероятность регуляции менструального ритма в зависимости от уровня АМГ и титра *Clostridium leptum gr.*

Добавление пробиотика к терапии метформином не оказало дополнительного положительного эффекта на состав КМ: в обеих группах на фоне терапии отмечено снижение УПМ *C. perfringens gr.* и *C. difficile*. Увеличилось количество симбионта *A. muciniphila* в среднем на 20%, а также отмечена тенденция к увеличению количества *Clostridium leptum gr.*, которое было снижено до лечения. Отсутствие преимуществ комбинированной терапии на КМ возможно связано с составом пробиотика, в который входят молочнокислые бактерии и бифидобактерии, а не те симбионтные бактерии, снижение которых было у пациенток до лечения.

ВЫВОДЫ

1. При СПКЯ каждая вторая пациентка с ИМТ < 25 кг/м² имеет неблагоприятный метаболический профиль, характеризующийся избытком жировой ткани, локализованной преимущественно в висцеральной области, который в каждом третьем случае ассоциирован с инсулинорезистентностью, гиперинсулинемией, дислипидемией, в каждом пятом – с нарушением толерантности к глюкозе.

2. У всех пациенток с ИМТ \geq 23 кг/м² имеется избыток жировой ткани, в половине случаев сочетающийся с наличием гиперинсулинемии и инсулинорезистентности, а в 22% случаев – с нарушением толерантности к глюкозе.
3. Для пациенток с СПКЯ характерны признаки хронического субклинического воспаления в виде повышения уровня СРБ и/или IL-6 в каждом третьем случае и усугубляющегося наличием избытка жировой ткани и особенно ожирения.
4. У пациенток с СПКЯ имеются нарушения стабильности состава кишечной микробиоты в виде снижения видового богатства, усугубляющегося избытком жировой ткани, о чем свидетельствует снижение индекса Маргалефа.
5. В видовом составе кишечной микробиоты при СПКЯ наблюдается увеличение численности УПМ (*Clostridium perfringens* gr, *Thomasclavelia ramosa* и *Staphylococcus aureus*), ассоциированное с хроническим субклиническим воспалением, избытком жировой ткани и формированием инсулинорезистентности, на фоне снижения колонизационных показателей *Clostridium leptum* gr. (включая *F. prausnitzii*), симбионтных видов *Bacteroides* spp. и ряда других бактерий, продуцирующих КЖК и поддерживающих колонизационную резистентность кишечника.
6. Шестимесячный курс терапии метформином приводит к восстановлению ритма менструаций у 54,4% пациенток на фоне улучшения эндокринно-метаболических параметров, маркеров хронического воспаления и коррекции состава кишечной микробиоты: снижения колонизационных показателей условных патогенов *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile* и *Staphylococcus* spp. в сочетании с повышением симбионта *Akkermansia muciniphila*.
7. Трехмесячный курс комбинированной терапии метформином и пробиотиком (на основе молочнокислых бактерий и *Bifidobacterium* spp.), в отличие от монотерапии не оказывает дополнительного положительного эффекта на уровень андрогенов, метаболический профиль и состав КМ.

8. Исходный уровень АМГ 12,7 нг/мл и менее и увеличение численности группы *Clostridium leptum* в составе кишечной микробиоты $>9 \lg$ (ГЭ/г) можно рассматривать в качестве предиктора эффективности терапии метформином (AUC=0,812, чувствительность 66,7 и специфичность 84,2).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с СПКЯ репродуктивного возраста, независимо от ИМТ, целесообразно проводить оценку композиционного состава тела методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии с целью диагностики избытка жировой ткани и характера ее распределения, а также определения количества висцеральной жировой ткани.

2. При отсутствии возможности проведения оценки композиционного состава тела ИМТ $\geq 23 \text{ кг/м}^2$ может служить маркером избытка жировой ткани и высокого риска развития метаболических нарушений (инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, нарушение толерантности к глюкозе, дислипидемия).

3. Высокая частота метаболической дисфункции у пациенток с СПКЯ при нормальном ИМТ подтверждает необходимость проведения перорального глюкозотолерантного теста, оценки липидного спектра крови, а также модификации образа жизни, направленной на нормализацию параметров композиционного состава тела и профилактику набора веса.

4. Учитывая высокую вероятность дисбаланса микробных сообществ кишечника, трудоемкость метода культуromики, пациенткам с СПКЯ целесообразно проводить исследование кишечной микробиоты методом ПЦР в реальном времени ввиду его доступности и высокой информативности. При этом особое внимание следует уделять представленности бактерий *Clostridium leptum* gr. и *Akkermansia muciniphila*, ассоциированных со снижением риска инсулинорезистентности.

5. При СПКЯ, независимо от массы тела, с целью коррекции эндокринно-метаболических нарушений целесообразно проведение терапии метформином. На фоне 6-ти месячного курса метформина (1500 мг/сут) регуляцию ритма

менструаций можно ожидать у каждой 2-й пациентки без дополнительного назначения прогестагенов.

6. При исходном значении АМГ $\leq 12,7$ нг/мл и высоком уровне колонизации кишечника симбионтными микроорганизмами группы *Clostridium leptum* (>9 Lg ГЭ/г) можно ожидать более высокую эффективность терапии метформином.

7. Трехмесячный курс терапии метформином и пробиотиком не имеет преимуществ в сравнении с монотерапией метформином для коррекции эндокринно-метаболических параметров и нарушений кишечной микробиоты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Синдром поликистозных яичников и микробиота кишечника / Чернуха Г.Е., **Мирошина Е.Д.**, Припутневич Т.В. // **Акушерство и гинекология**, №3, 2021г, С. 36-43.
2. Индекс массы тела, композиционный состав тела и метаболический профиль пациенток с синдромом поликистозных яичников / Чернуха Г.Е., **Мирошина Е.Д.**, Кузнецов С.Ю., Иванов И.А. // **Акушерство и гинекология**, №10, 2021г, С. 103-111.
3. Избыток жировой ткани и хроническое субклиническое воспаление при синдроме поликистозных яичников / **Кириллова Е.Д.**, Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Иванец Т.Ю., Чернуха Г.Е. // **Акушерство и гинекология**, №4, 2023г, С. 111-119.
4. Особенности микробиоты кишечника у пациенток с синдромом поликистозных яичников / **Кириллова Е.Д.**, Муравьева В.В., Исаева Е.Л., Скоробогатый А.В., Жигалова К.Н., Козлова А.А., Припутневич Т.В., Чернуха Г.Е. // **Вестник Российской академии медицинских наук**, Т. 78, №4, 2023г, С. 269-280.
5. Индекс массы тела, композиционный состав тела и метаболический профиль пациенток с синдромом поликистозных яичников / Чернуха Г.Е.,

Мирошина Е.Д., Кузнецов С.Ю., Иванов И.А. // Материалы XXII Всероссийского научного форума «Мать и Дитя – 2021» - М., 2021.

6. Особенности композиционного состава тела пациенток с СПКЯ / Чернуха Г.Е., **Мирошина Е.Д.**, Кузнецов С.Ю., Иванов И.А. // Материалы XVI Международного конгресса по репродуктивной медицине - М., 2022.

7. Кишечная микробиота и хроническое субклиническое воспаление у пациенток с СПКЯ / **Кириллова Е.Д.**, Муравьева В.В., Исаева Е.Л., Скоробогатый А.В., Жигалова К.Н., Бембеева Б.О., Припутневич Т.В., Чернуха Г.Е. // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Профилактическая медицина – вчера, сегодня, завтра» - М., 2023.