

УДК 618.177-089.888.11:618.15-008.87

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ВАГИНАЛЬНОГО БИОТОПА ПАЦИЕНТОК, ОППОЗИТНЫХ ПО ФЕРТИЛЬНОСТИ В ПРОГРАММЕ ЭКО

Е.А. Кремлева^{1,2}, О.Д. Константинова², С.В. Черкасов¹,

¹Учреждение РАН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН», г. Оренбург,

²ГОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия»

Кремлева Елена Александровна – e-mail: kremlena1@mail.ru

Представлены результаты исследования состояния вагинальной микрофлоры и цитокинового статуса вагинального содержимого 52 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в зависимости от исходов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Была выявлена связь неблагоприятных исходов ЭКО с дефицитом лактофлоры влагалища и повышенным содержанием в вагинальной жидкости ФНО, ИЛ-1b и ИЛ-8.

Ключевые слова: бесплодие, вагинальный микробиоценоз, лактобактерии, цитокины, экстракорпоральное оплодотворение.

The results of studying the state of vaginal flora and vaginal cytokine content of 52 women with tubal-peritoneal infertility depending of the in vitro fertilization (IVF) outcome was presented. An association of adverse outcomes of IVF with a deficit vaginal lactoflora and increased levels of TNF-, IL-1b and IL-8 in vaginal fluid was founded.

Key words: infertility, vaginal microbiocenosis, lactobacilli, cytokines, in vitro fertilization.

Введение

Несмотря на последние достижения современной медицины, проблема бесплодия остается актуальной по сей день [1]. Благодаря развитию вспомогательных репродуктивных технологий удается решить проблемы, связанные с овуляцией, транспортом яйцеклетки, оплодотворением, качеством эмбриона и гормональным сопровождением беременности. Но по-прежнему одним из наиболее сложных вопросов репродуктологии остается обеспечение адекватного процесса имплантации. Срыв процесса имплантации, регуляция которого осуществляется при взаимодействии эндокринной и иммунных систем и опосредуется цитокинами [2], связывают с наличием генитальных инфекций, которые зачастую протекают латентно и сопровождаются микроэкологическими изменениями в биотопах репродуктивного тракта [3]. К сожалению, элиминация генитальной инфекции не всегда приводит к восстановлению фертильности, что возможно связано с остаточными микроэкологическими изменениями в репродуктивной системе. Очевидно, что микроэкологическое состояние определяется не только состоянием микрофлоры, но и иммунологическими и биохимическими параметрами биотопа, в том числе и цитокиновым статусом, являющимся результирующей взаимодействия микробиоты с макроорганизмом. Однако, данные о влиянии микроэкологического состояния нижних отделов репродуктивного тракта на возможность реализации фертильной функции отсутствуют. Это и послужило посылком к настоящему исследованию.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка цитокинового профиля вагинальной жидкости и микробиоценоза влагалища у пациенток, оппозитных по фертильности в программе ЭКО.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 52 женщины в возрасте от 27 до 39 лет (средний возраст – $32 \pm 0,4$ года), которым проводилось лечение трубно-перитонеального бесплодия методом ЭКО. Индукцию суперовуляции проводили по стандартным протоколам. Продолжительность бесплодия варьировала от 3 до 13 лет. В 68% случаев имело место первичное бесплодие, в 32% – вторичное, обусловленное преимущественно трубно-перитонеальным фактором. Выявление мужского фактора бесплодия являлось критерием исключения пациентки из исследования. Все клинико-лабораторные исследования выполняли после получения информированного согласия обследуемых женщин.

Сбор анамнестических данных проводили путем анкетирования и выкопировки данных из карты амбулаторного больного.

Вагинальное содержимое получали на 8–10-й день цикла, предшествующего стимуляции суперовуляции, с помощью стерильного катетера, омывая стенки влагалища 2 мл стерильного физиологического раствора. Для ингибирования активности протеаз к полученной пробе добавляли фенилметилсульфонилфлюорид до концентрации 5 мкМ/мл.

Определение концентрации цитокинов ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-1 и ФНО проводили иммуноферментным методом, используя наборы производства ООО «Цитокин» по протоколам, указанным в инструкции.

Одновременно с этим проводили микробиологическое исследование вагинального отделяемого, включающее микроскопию мазка, окрашенного по Граму, и культуральное исследование влагалищного отделяемого с использованием общепринятых методов выделения и идентификации условно-патогенных микроорганизмов. О воспалительной реакции судили по количеству лейкоцитов в вагинальном содержимом.

Статистическую обработку проводили методами непараметрической статистики, согласно рекомендациям [4].

Результаты исследования. В результате ЭКО удалось достичь беременности у 26 женщин, которые составили первую группу, во вторую группу вошли 28 женщин с отрицательным результатом ЭКО. Группы были сопоставимы по среднему возрасту ($31,9 \pm 0,7$ в группе с положительным исходом ЭКО, $32,6 \pm 0,6$ в группе с отрицательным исходом ЭКО), длительности и формам бесплодия, гормональному статусу, медикаментозным протоколам индукции суперовуляции.

Анализ частоты встречаемости генитальных инфекций в течение 6 месяцев, предшествующих циклу ЭКО, показал, что женщины, которым не удалось реализовать фертильную функцию в цикле ЭКО, чаще страдали от трихомонадной инфекции и бактериального вагиноза, по сравнению с женщинами с позитивным исходом ЭКО (таблица 1), при этом достоверных различий по частоте хламидиоза, уреаплазмоза и гонореи в исследуемых группах выявлено не было.

ТАБЛИЦА 1.
Частота генитальных инфекций за 6 месяцев, предшествующих циклу ЭКО

	Результат ЭКО позитивный (n=26)	Результат ЭКО негативный (n=28)
Chlamydia trachomatis	42,3±9,8%	42,9±9,5%
Trichomonas vaginalis	0%	17,9±7,3%*
Ureaplasma urealyticum	3,8±3,8%	7,1±4,9%
Neisseria gonorrhoeae	0%	0%
Бактериальный вагиноз	3,8±3,8%	21,4±7,9%*

Примечание: * $p < 0,05$ – достоверная разница между группами.

При ретроспективном анализе содержания цитокинов в вагинальном содержимом женщин, оппозитных по исходам ЭКО, установлено, что отсутствие беременности сопряжено с более высоким уровнем ИЛ-8, ИЛ-1 и ФНО (таблица 2), что отражает общую провоспалительную настроенность. Так, в группе женщин, лечение которых оказалось неэффективным, средний уровень ИЛ-8 составлял 855 ± 64 пг/мл против 557 ± 54 пг/мл ($p = 0,01$) в группе женщин, у которых удалось получить клиническую беременность. Средний уровень ИЛ-1 в группе с неудачами ЭКО почти на порядок превышал уровень, зафиксированный у женщин с благоприятным исходом лечения: 321 ± 94 пг/мл и 43 ± 11 пг/мл ($p = 0,02$).

Различия в уровне ФНО также оказались достоверными: $4,5 \pm 0,9$ пг/мл и $0,9 \pm 0,3$ пг/мл соответственно ($p = 0,002$). Уровень цитокина ИЛ-6 в вагинальном содержимом женщин с оппозитными исходами ЭКО не отличался, составляя $42 \pm 9,9$ пг/мл и $47 \pm 11,9$ пг/мл ($p = 0,77$).

ТАБЛИЦА 2.
Концентрация цитокинов в вагинальном содержимом

	Результат ЭКО позитивный (n=26)	Результат ЭКО негативный (n=28)
ил6 (пг/мл)	43,0±12,0	47,3±9,4
фно (пг/мл)	1,0±0,3	4,5±1,0 *
ил8 (пг/мл)	557,0±89,7	854,6±84,1 *
ил16 (пг/мл)	41,3±10,3	321,1±118,2 *

Примечание: * $p < 0,05$ – достоверная разница между группами.

Результаты микробиологического исследования показали, что состояние пациенток обеих групп соответствовало требованиям, предъявляемым к участникам программ вспомогательных репродуктивных технологий, подразумевающих отсутствие инфекций, передаваемых половым путем, и неспецифических воспалительных заболеваний репродуктивного тракта. Сравнительный анализ микрофлоры влагалища в группах с оппозитными исходами ЭКО выявил, что состояние микрофлоры влагалища женщин, попытка ЭКО которых завершилась неудачей, характеризовалось относительным дефицитом лактофлоры $4,3 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл против $5,4 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл в подгруппе женщин с благоприятным исходом ЭКО ($p = 0,03$), при этом достоверных отличий в обсемененности условно патогенными микроорганизмами или их видовой характеристики не наблюдалось. Количество лейкоцитов в вагинальном содержимом не превышало пределов нормы, но имело достоверные отличия в группах – $5,2 \pm 0,47$ лейкоцитов в поле зрения в первой группе против $8,5 \pm 1,5$ лейкоцитов в поле зрения во второй группе ($p = 0,04$).

Корреляционный анализ позволил выявить обратную связь между показателем микробной обсемененности (ПМО) влагалища лактобактериями и концентрацией в вагинальном лавже ИЛ-1 ($r = -0,44$, $p < 0,05$), ИЛ-8 ($r = -0,38$, $p < 0,05$), ИЛ-6 ($r = -0,30$, $p < 0,05$), прямую зависимость уровня ИЛ-1 ($r = 0,54$, $p < 0,05$) от микробной обсемененности условно- патогенными микроорганизмами и прямую связь между количеством лейкоцитов и концентрацией ИЛ-8 ($r = 0,44$, $p < 0,05$) в вагинальном содержимом.

Наступление в результате ЭКО беременности имело прямую связь с показателем микробной обсемененности влагалища лактобактериями ($r = 0,30$, $p < 0,05$) и обратную связь с концентрацией в вагинальном содержимом ИЛ-1 ($r = -0,32$, $p < 0,05$), ИЛ-8 ($r = -0,36$, $p < 0,05$), ФНО ($r = -0,41$, $p < 0,05$).

Обсуждение. Результаты проведенного исследования позволяют связать неблагоприятный исход ЭКО со следующими факторами, отражающими микробиологическое состояние нижних отделов репродуктивного тракта:

- перенесенными в последние 6 месяцев трихомониазом и/или бактериальным вагинозом;

- снижением микробной обсемененности влагалища лактобактериями;
- повышенным уровнем ФНО, ИЛ-1 и ИЛ-8 в вагинальном содержимом.

Отличия по частоте встречаемости трихомониаза могут свидетельствовать либо о переходе инфекции в стадию, затруднительную для диагностики, либо о наличии постинфекционных изменений в микроэкологии репродуктивного тракта, требующих дополнительных реабилитационных мероприятий.

Связь исходов ЭКО с микробной обсемененностью влагалища доминантным микросимбиотом (лактобактериями) свидетельствует о значимости микробиоты репродуктивного тракта женщин для реализации фертильной функции макросимбионта, что с позиции биологической целесообразности понятно и оправдано, так как возможность развития и рождения нового макроорганизма в условиях нормобиоценоза обеспечивает становление нормальной микрофлоры новорожденного [5], и может препятствовать возникновению осложнений беременности и родов [6].

Выявленные отличия уровня цитокинов вагинальной жидкости женщин, оппозитных по фертильности в программе ЭКО, свидетельствуют либо о влиянии цитокинов нижних отделов репродуктивного тракта на процесс имплантации, либо о том, что изменения, происходящие в цитокиновом профиле вагинального содержимого, являются отражением процессов, происходящих в цитокиновой системе всего репродуктивного тракта. В любом случае уровень вагиналь-

ных цитокинов может служить прогностическим критерием готовности макроорганизма к возникновению беременности.

С другой стороны, связь неудачных исходов ЭКО с повышенным уровнем цитокинов вагинальной жидкости указывает на роль цитокинов нижних отделов репродуктивного тракта в возникновении и развитии беременности, и открывает перспективы поиска терапевтических воздействий, способных прямо или косвенно снижать уровень провоспалительных цитокинов в вагинальном биотопе, нормализуя микроэкологическое состояние репродуктивного тракта.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможном влиянии состояния микробиоценоза и цитокинового профиля вагинального биотопа на фертильность и обуславливают необходимость изучения факторов, определяющих микроэкологическое состояние репродуктивного тракта женщин при бесплодии, что может иметь как диагностическое, так и терапевтическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаков В.И. Лечение женского и мужского бесплодия. М.: МИА, 2005. 592 с.
2. Ширшев С.В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции. Екатеринбург: УрО РАН, 2002. Т. 1. 140 с.
3. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
5. Orrhage K., Nord C.E. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. Acta Paediatr 1999. № 88 (430). P. 47–57.
6. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. СПб.: ООО «Нева-Люкс», 2001. 364 с.