

DOI: 10.26693/jmbs07.01.150

УДК 618.12-002-036.12-036.838-06-07-085-059

Постоленко В. Ю., Авраменко Н. В.,

Барковський Д. Є.

СТАН МІКРОФЛОРИ ТА СТУПІНЬ ВИРАЖЕНОСТІ МІСЦЕВОГО ІМУННОГО ЗАХИСТУ В ЕНДОМЕТРІЇ ЖІНОК З БЕЗПЛІДДЯМ, ЩО РОЗВИВАЄТЬСЯ НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО ЕНДОМЕТРИТУ ПОЄДНАНОГО З БАКТЕРІАЛЬНИМ ВАГІНОЗОМ

Запорізький державний медичний університет, Україна

Метою роботи було оцінити таксономічний профіль мікробіоти та стан місцевого імунітету в ендометрії жінок з безпліддям за умов хронічного ендометриту поєднаного з бактеріальним вагінозом.

Матеріали та методи. В дослідженні прийняли участь 40 жінок репродуктивного віку, середній вік яких складав $33 \pm 4,2$ роки. Діагностику ендометриту в хронічній формі проводили за клінічною симптоматикою, анамнезом хвороби, вискоблюванням, ендоскопічним та ультразвуковим дослідженнями. Діагностику бактеріального вагінозу в пацієнток проводили за виявленням підвищення рН вагінального секрету $>4,5$, наявністю гомогенних вагінальних виділень із неприємним запахом, виявленням вагінальних епітеліоцитів з адгезованими на них грамваріабельними мікроорганізмами, виявленням «рибного» запаху.

Результати. Показано, що зниження рівня Т-хелперів та підвищення рівня Т-супресорів/кілерів в ендометрії посилюються у пацієнток, у яких хронічний ендометрит розвивається на фоні бактеріального вагінозу. Так, рівень CD4⁺-клітин знижувався у 1,6 рази, а рівень CD8⁺-клітин підвищувався у 1,9 рази порівняно з показником здорових жінок. На цьому фоні знижувався рівень В-лімфоцитів та IgA в ендометрії жінок з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом.

Висновки. Розвиток хронічного ендометриу асоційований з підвищенням частоти детекції та кількісного вмісту в ендометрії *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, бактерій родини *Enterobacteriaceae*, виявленням *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* порівняно із показниками здорових жінок. Розвиток бактеріального вагінозу супроводжується виявленням в ендометрії нових видів мікроорганізмів – *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*

Дисбаланс мікрофлори ендометрію супроводжується достовірними порушеннями місцевого клітинного та гуморального імунного захисту, який виражається зниженням рівня Т-хелперів, В-лімфоцитів та IgA з одночасним підвищенням Т-супресорів/кілерів у жінок з хронічним ендометритом.

Встановлені зміни посилюються при бактеріальному вагінозі.

Ключові слова: мікрофлора, ендометрій, хронічний ендометрит, бактеріальний вагіноз, безпліддя, місцевий імунітет.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи кафедри акушерства, гінекології та репродуктивної медицини ФПО ЗДМУ «Корекція репродуктивних порушень у подружніх пар, що страждають на непліддя, в умовах великого промислового центру», № держ. реєстрації 0118U007140.

Вступ. Проблема інфекцій статевих органів сьогодні одна з найзначимих в клінічній медицині, оскільки актуальність її вивчення визначається не тільки рівнем захворюваності, але й наслідками для репродуктивного здоров'я жінок [1]. У здорових жінок репродуктивного віку типова мікрофлора статевих органів включає аеробну мікрофлору, факультативні анаеробні та облигатні анаеробні види бактерій [2]. У вагінальній мікрофлорі більшості жінок переважають лактобактерії. Мікробіота статевих органів у жінок, як правило, існує симбіотично з макроорганізмом і, як вважають [3, 4], захищає від патогенних бактерій через вироблення молочної кислоти та антимікробних побічних продуктів метаболізму, а також шляхом активації імунної системи. Проте, значне збільшення кількості лактобактерій збільшує ризик зараження інфекціями, що передаються статевим шляхом [5]. Причому, інфекція висхідним шляхом може поширитися у статеві органи.

Бактеріальний вагіноз – поширене явище серед жінок репродуктивного віку, який характеризується інфекційним ураженням нижніх статевих шляхів та змінами нормальної мікрофлори піхви. Одним із ускладнень бактеріального вагінозу може бути хронічний ендометрит – хронічне запалення внутрішнього шару матки (ендометрію) [6]. Розвиток хронічного ендометриу призводить до порушень менструального циклу, маткових кровотеч, до безпліддя або невиношування вагітності. Запальні зміни в ендометрії під час хронічного

ендометриту супроводжуються порушеннями імплантації заплідненої яйцеклітини в матці або сприяють відторгненню ембріону відразу після імплантації [7].

В генезі ендометріальної дисфункції при хронічному ендометриті провідна роль належить порушенням рецептивності ендометрія, змінам місцевого імунітету, що виражається патологією репродуктивної функції [8]. Окрім того, причинами розвитку патологічного процесу в ендометрії можуть бути зміни стану місцевого імунітету (Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, імуноглобуліну А (IgA), циркулюючих імунних комплексів), ендокринні розлади, антибактеріальна терапія, супутні запальні захворювання жіночих статевих органів, хірургічні та діагностичні втручання, застосування контрацептивів (пероральних, внутрішньоматкових) [9].

Слід підкреслити, що при хронічному ендометриті основною проблемою є порушення рецепторного профілю ендометрія, оскільки запальний процес служить кофактором і призводить до зниження експресії рецепторів за рахунок порушення кровотоку тканини і фіброзу в стромі ендометрія [8].

Мета роботи. Вивчити таксономічний профіль мікробіоти та стан місцевого імунітету в ендометрії жінок з безпліддям за умов хронічного ендометриту поєданого з бактеріальним вагінозом.

Матеріали та методи дослідження. У дослідження включили 28 жінок репродуктивного віку, середній вік яких складав $33 \pm 4,2$ роки, які звернулися за медичною допомогою з приводу вирішення репродуктивних проблем (безпліддя). Контрольну групу склали 12 здорових жінок. Огляд пацієнтів та лабораторне дослідження біологічного матеріалу проводили на базі гінекологічного відділення комунального неприбуткового підприємства «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької обласної ради.

Критерії включення: репродуктивний вік 21-45 років, регулярний менструальний цикл; інтервальний період, обтяжений гінекологічний анамнез: безпліддя, хронічний ендометрит, бактеріальний вагіноз.

Критерії виключення: онкологічні захворювання; гормональна і внутрішньоматкова контрацепція; антибактеріальна терапія протягом чотирьох тижнів до обстеження.

Усіх жінок розділили на три групи: I група – 12 здорових жінок, які не мали ознак хронічного ендометриту та склали контрольну групу; II група – пацієнтки з вираженим хронічним ендометритом ($n = 16$); III група – пацієнтки, у яких хронічний ендометрит розвивався на фоні бактеріального вагінозу ($n = 12$).

При діагностиці ендометриту в хронічній формі, крім клінічної симптоматики й анамнезу хво-

роби, проводили ендоскопічне та ультразвукове дослідження. За допомогою діагностичного вискоблювання слизової оболонки матки підтверджували діагноз хронічного ендометриту. Діагностику бактеріального вагінозу в пацієнтів групи III проводили за виявленням таких симптомів (критерії Amsel, 1983): підвищення рН вагінального секрету $>4,5$; наявність гомогенних вагінальних виділень із неприємним запахом; виявлення вагінальних епітеліоцитів з адгезованими на них грамваріабельними мікроорганізмами; виявлення «рибного» запаху.

Дослідження проводили у другій фазі менструального циклу (18–23-й день). Аспірат ендометрія для дослідження мікрофлори відбирали за допомогою пристрою для отримання ендометральної цитології Endobrush Standard for Endometrial Cytology (Laboratoire C.C.D.; Франція). Техніка отримання зразків ендометрію включала кілька етапів: 1) шийку матки обробляли тампоном, змоченим 0,05%-м розчином хлоргексидину; 2) не торкаючись стінок піхви, в порожнину матки вводили пристрій; 3) зразок ендометрію переносили в рідину PreservCyt Solution для вивчення клітинних зразків під час діагностики *in vitro*. Набір реактивів містив суміш для ПЛП-ампліфікації, специфічну для визначення загальної бактеріальної маси, що дозволяє провести оцінку 24 груп мікроорганізмів. ПЛП в реальному часі проводили згідно з інструкцією виробника в ампліфікаторі з детекцією результатів в режимі реального часу детектуючим ампліфікатором. Кількість мікроорганізмів виражали в геномних еквівалентах на мл (ГЕ/мл).

З метою вивчення місцевого імунітету використовували антитіла до CD4 (Т-лімфоцити – хелпери) клон SP35, CD8 (Т-лімфоцити – супресори/кілери) клон SP57, CD20 (зрілі В – лімфоцити) клон L26 фірми «DAKO», (Данія). Стан гуморальної ланки місцевого імунітету в ендометрії оцінювали за рівнем IgA, який визначали імуноферментним методом («Humalalyzer 2000»).

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. Всі пацієнтки були інформовані щодо цілей, організації, методів дослідження та підписали інформовану згоду щодо участі у ньому, і вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнток.

Для оцінки достовірності відмінностей між середніми показниками досліджуваних груп розраховували критерії Манна-Уїтні (при порівнянні показників між двома досліджуваними групами) і

Краскела- Уоллеса (при порівнянні показників між трьома досліджуваними групами) в програмі IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp.; США). У всіх випадках відмінності інтерпретували як достовірні при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Однією з причин розвитку хронічного ендометриу є порушення нормальної мікрофлори піхви, яка в нормі забезпечує колонізаційну резистентність генітального тракту та попереджає заселенню піхви патогенною мікрофлорою або попереджає надмірне розмноження умовно-патогенної мікрофлори [10]. Зміни бактеріальної мікрофлори піхви можуть відобразитися у змінах складу мікрофлори ендометрію.

Аналіз мікробіому ендометрію здорових жінок показав, що у порожнині матки наявна мікробна флора, що підтверджує факт про нестерильність порожнини цього репродуктивного органу [11, 12]. Так, у 83% зразках ендометрію здорових жінок було виявлено *Lactobacillus spp.*, у 75% – *Eubacterium spp.*, у 58% – *Staphylococcus spp.*, у 33% – *Enterobacteriaceae*, у 25% – *Candida spp.*, у 25% – *Mycoplasma hominis* (табл. 1).

Виявлений бактеріальний фон ендометрія здорових жінок, очевидно, має значення для імплантації ембріона, оскільки відомо, що наявність молочнокислих бактерій (*Lactobacillus spp.*) в ендометрії сприяє цьому процесу [12].

Оскільки хронічний ендометрит – стійке запалення слизової оболонки ендометрію, яке викликається наявністю бактеріальних збудників у порож-

нині матки [2], то доречно проаналізувати частоту виявлення різних видів бактерій у цієї групи пацієнтів. Результати проведених досліджень показали, що найпоширенішими бактеріями у пацієнтів з хронічним ендометритом є *Staphylococcus spp.* зустрічається у 75% пацієнток, *Streptococcus spp.* – у 58%, *Enterobacteriaceae* – у 50%, *Enterococcus faecalis* – у 37,5 %, *Gardnerella vaginalis* – у 31,3%, *Mycoplasma spp.* – у 25 %, *Eubacterium spp.* – 25%, *Candida spp.* – 26,9 %, *Atopobium vaginae* – 18,8% та інші патогени, пов'язані з інфекціями статевих шляхів, а саме: *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* та *Neisseria gonorrhoeae* (табл. 1).

Отже, за умов розвитку хронічного ендометриу підвищується частота виявлення у жінок умовно-патогенних та патогенних бактерій. Водночас, *Lactobacillus spp.* зустрічається лише у 43,8% жінок з хронічним ендометритом (табл. 1).

Аналіз частоти виявлення різних видів бактерій у пацієнток з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом показав, що у результаті дисбалансу мікрофлори піхви, що супроводжує бактеріальний вагіноз, змінюється і мікрофлора ендометрію. Так, у цієї групи пацієнток у мікробіомі ендометрію частіше зустрічаються облигатно-анаеробні бактерії – *Gardnerella vaginalis* зустрічається у 41% пацієнток, *Prevotella spp.* – у 41%, *Atopobium vaginae* – у 25%, *Mycoplasma* – у 50%, *Mobiluncus spp.* – у 41% (табл. 1).

Отже, розвиток хронічного ендометриу супроводжується збільшенням частоти виявлення різноманітнішого спектру мікробіоти в ендометрії матки. Розвиток хронічного ендометриу на фоні бактеріального вагінозу збільшує частоту виявлення саме умовно-патогенної анаеробної мікрофлори у ендометрії порівняно із жінками без бактеріального вагінозу. Встановлений факт спонукав нас до кількісного визначення бактеріальної мікрофлори в ендометрії матки.

Результати аналізу кількісного вмісту мікроорганізмів в ендометрії здорових жінок показали, що домінуючою мікрофлорою є *Lactobacillus spp.*, кількість яких становить 129×10^3 ГЕ/мл, що відповідає 94,9% усієї

Таблиця 1 – Частота виявлення різних видів мікроорганізмів у пацієнток з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом

Здорові жінки		Пацієнтки з хронічним ендометритом		Пацієнтки з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом	
Мікроорганізми	%	Мікроорганізми	%	Мікроорганізми	%
<i>Lactobacillus spp.</i>	83	<i>Staphylococcus spp.</i>	75	<i>Staphylococcus spp.</i>	75
<i>Eubacterium spp.</i>	75	<i>Streptococcus spp.</i>	58	<i>Streptococcus spp.</i>	66
<i>Staphylococcus spp.</i>	58	<i>Enterobacteriaceae</i>	50	<i>Enterobacteriaceae</i>	66
<i>Enterobacteriaceae</i>	33	<i>Lactobacillus spp.</i>	43	<i>Enterococcus faecalis</i>	58
<i>Candida spp.</i>	25	<i>Enterococcus faecalis</i>	38	<i>Gardnerella vaginalis</i>	50
<i>Mycoplasma hominis</i>	25	<i>Gardnerella vaginalis</i>	31	<i>Mycoplasma spp.</i>	50
		<i>Mycoplasma spp.</i>	25	<i>Eubacterium spp.</i>	25
		<i>Eubacterium spp.</i>	25	<i>Gardnerella vaginalis</i>	41
		<i>Candida spp.</i>	27	<i>Prevotella spp.</i>	41
		<i>Atopobium vaginae</i>	19	<i>Mobiluncus spp.</i>	41
		<i>Ureaplasma urealyticum</i>	13	<i>Lactobacillus spp.</i>	33
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	6	<i>Candida spp.</i>	33
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6	<i>Atopobium vaginae</i>	25
				<i>Ureaplasma urealyticum</i>	25
				<i>Chlamydia trachomatis</i>	25
				<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	17

мікрофлори піхви. При такому кількісному показнику колонізації співвідношення анаеробної флори до аеробної становить 10:1, кількість умовно-патогенних мікроорганізмів (*Staphylococcus spp.*, *Mycoplasma spp.* та ін.) досягає 7% (табл. 2).

Лактобацили є представниками нормальної вагінальної мікрофлори і можуть контамінувати в слизову оболонку матки, не викликаючи розвитку запального процесу, тобто їх наявність клінічно незначуща. Підвищений рівень *Lactobacillus spp.* у ендометрії здорових жінок може сприяти імплантації. Відомо, що середня стадія фази секреції – найкращий період для імплантації бластоцисти, оскільки в цей період в порожнину матки виділяється «живильне середовище», необхідне для трофіки бластоцисти, яке складається з глікогену, мукополісахаридів, глюкози [13]. Імовірно, глікоген в необхідній кількості присутній в ендометрії та служить субстратом для розмноження лактобацил, які, в свою чергу, створюють несприятливі умови для розмноження умовно-патогенних мікроорганізмів і тим самим позитивно впливають на імплантацію [11, 13]. У здорових жінок лактобацили здатні продукувати пероксид гідрогену і, цим самим, пригнічувати ріст і перешкоджати розмноженню умовно-патогенних мікроорганізмів і облигатних анаеробів [13].

У групи пацієнок з хронічним ендометритом мікробіота ендометрія характеризувалася значним збільшенням кількості стрептококів ($1,2 \pm 0,213 \times 10^3$ ГЕ/мл, які не виявлялися у здорових жінок (табл. 2). Поряд з цим в ендометрії збільшувалася кількість стафілококів – в 1,4 рази і ентеробактерій – в 1,6 рази порівняно з показниками здорових жінок (табл. 2). У пацієнок з хронічним ендометритом виявлені такі мікроорганізми: *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, які у здорових жінок не виявлялися (табл. 2).

Поряд із підвищенням рівня умовно-патогенних мікроорганізмів, у жінок з ендометріозом спостерігається зниження в ендометрії концентрації *Lactobacillus spp.* до $(49 \pm 2,1) \times 10^3$ ГЕ/мл (у здорових жінок $(129 \pm 9,8) \times 10^3$ ГЕ/мл).

Аналіз бактеріальної мікрофлори в зразках ендометрію хворих хронічним ендометріозом та супутнім бактеріальним вагінозом показав зв'язок між хронічним ендометритом і більшістю асоційованих з бактеріальним вагінозом бактерій.

У групі жінок з хронічним ендометритом і бактеріальним вагінозом в ендометрії підвищується концентрація *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* та виявляються нові види мікроорганізмів – *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*, які не характерні для пацієнок з хронічним ендометріозом, але без бактеріального вагінозу (табл. 2).

Поряд з цим, при бактеріальному вагінозі спостерігається значне зниження концентрації лактобацил порівняно з показниками пацієнок з хронічним ендометритом без бактеріального вагінозу. Встановлений факт може призвести до значного зниження кислотності, що відбувається за рахунок сукупності дії й інших мікроорганізмів. Це свідчить про те, що бактеріальний вагіноз є полімікробним захворюванням та може ускладнювати перебіг хронічного ендометриту.

Результати отриманих досліджень дозволяють припустити наявність функціональної системи «мікробіота - ендометрій», яка характеризується переважанням лактобацил. В результаті дії факторів ризику при розвитку хронічного ендометриту та бактеріального вагінозу можлива зміна складу

Таблиця 2 – Концентрація мікроорганізмів у зразках ендометрію пацієнок з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом

Мікроорганізми	Групи досліджуваних пацієнок		
	здорові жінки	пацієнтки з хронічним ендометритом	пацієнтки з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом
	$\times 10^3$ ГЕ/мл (M \pm m)	$\times 10^3$ ГЕ/мл (M \pm m)	$\times 10^3$ ГЕ/мл (M \pm m)
<i>Lactobacillus spp.</i>	129 \pm 9,8	49 \pm 2,1*	31 \pm 2,1*.#
<i>Staphylococcus spp.</i>	6,2 \pm 0,76	8,1 \pm 0,67*	11,2 \pm 0,987*.#
<i>Streptococcus spp.</i>	-	1,2 \pm 0,213*	2 \pm 0,43*
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,1 \pm 0,532	6,7 \pm 0,175*	8,9 \pm 0,781*.#
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	2,3 \pm 0,098*	2,9 \pm 0,165*
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	2,1 \pm 0,132*	1,9 \pm 0,210*
<i>Mycoplasma spp.</i>	0,6 \pm 0,043	0,2 \pm 0,01*	0,2 \pm 0,021*
<i>Eubacterium spp.</i>	6,7 \pm 1,09	1,1 \pm 0,098*	0,8 \pm 0,056*
<i>Prevotella spp.</i>	-	-	1,5 \pm 0,123*.#
<i>Mobiluncus spp.</i>	-	-	2,1 \pm 0,31*.#
<i>Candida spp.</i>	1,3 \pm 0,21	0,8 \pm 0,076*	0,4 \pm 0,023*.#
<i>Atopobium vaginae</i>	-	0,2 \pm 0,012*	0,6 \pm 0,043*
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0,2 \pm 0,01	0,3 \pm 0,021	0,2 \pm 0,014
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	0,4 \pm 0,032*	0,4 \pm 0,032*
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	0,6 \pm 0,032*	0,4 \pm 0,023*.#

Примітка: * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками здорових жінок, $p < 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи пацієнок, хворих хронічним ендометритом, $p < 0,05$.

мікрофлори в ендометрії з наступним негативним впливом ряду факторів патогенності, що призводить до порушення морфофункціонального стану ендометрію, пошкодження трофобласта, порушення процесів імплантації, що, в свою чергу, призводить до розвитку безпліддя [12]. Зміни мікробіоти в ендометрії можуть сприяти зниженню місцевого імунітету при хронічному ендометриті.

Патофізіологічні зміни в ендометрії при хронічному ендометриті (некротичні процеси в тканинах, кров'яні згустки, фібринові нитки) створюють сприятливі умови для росту і розвитку мікроорганізмів. Перераховані умови визначають адгезію і penetрацію мікроорганізмів в тканину матки. У цьому випадку буде активуватися лімфоїдна тканина, яка намагатиметься обмежити і мінімізувати запальний процес. Цей процес може відбуватися за двома механізмами: 1) умовно-патогенні мікроорганізми зі своїми низькоімуногенними властивостями будуть ухилятися від контролювання системи імунітету; 2) високий ступінь поширення облигатних мікроорганізмів створює умови для здійснення їх патогенності [14].

Результати дослідження імунологічно статусу ендометрію здорових жінок показали наявність в ендометрії Т-хелперів та Т-супресорів/кілерів (рис. 1). Це може мати позитивне значення для настання та перебігу вагітності, оскільки стимуляція росту і диференціювання тканин плода відбувається під впливом гуморальних факторів імунітету, коли починається вироблення цитокінів, які залучаються в плаценту під впливом Т-лімфоцитів [15, 16].

Аналіз показників місцевого імунітету в ендометрії пацієнток, хворих хронічним ендометритом показав зниження рівня CD4⁺-клітин (Т-хелперів) з одночасним підвищенням рівня CD8⁺-клітин (Т-супресорів/кілерів). Так, середній рівень CD4⁺-клітин був достовірно знижений і складав (31,5±2,95)% порівняно з показником групи здорових жінок (41,8±4,38)%. Водночас, у хворих жінок спостерігалось підвищення рівня CD8⁺-клітин до показника (26,1±1,84)% порівняно з показником групи порівняння (17,4±1,25)% (рис. 1).

Зниження рівня Т-хелперів та підвищення рівня Т-супресорів/кілерів посилюються у пацієнток, у яких хронічний ендометрит розвивається на фоні бактеріального вагінозу (рис. 1). Так, рівень CD4⁺-клітин знижується у 1,6 рази (до показника (26,8±1,921)%) порівняно з контролем, а рівень CD8⁺-клітин підвищується у 1,9 рази (до показника (32,5±2,21)%) порівняно з показником здорових жінок (рис. 1).

Про порушення Т-клітинної ланки імунітету у пацієнток з хронічним ендометритом свідчило вірогідне зниження співвідношення імунорегулятор-

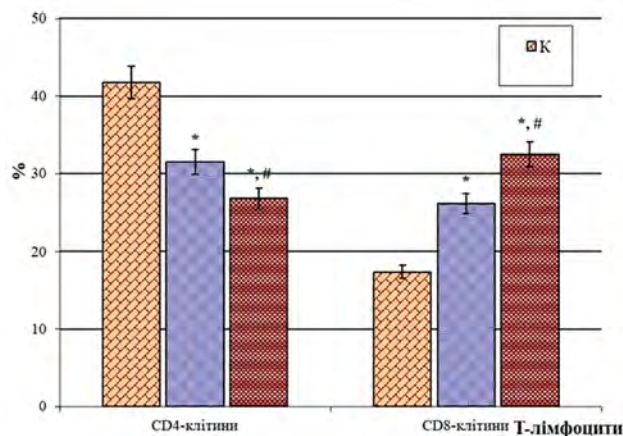


Рис. 1 – Рівень Т-лімфоцитів в ендометрії жінок з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом

Примітки: К – здорові жінки (контроль); ХЕ – пацієнтки з вираженим хронічним ендометритом; ХЕ+БВ – пацієнтки, у яких хронічний ендометрит розвивався на фоні бактеріального вагінозу; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками здорових жінок, $p < 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи пацієнток, хворих хронічним ендометритом, $p < 0,05$.

ного індексу CD4/CD8, який у пацієнток II групи становив $1,21 \pm 0,09$, а у пацієнток III групи становив $0,83 \pm 0,06$ проти $2,4 \pm 0,34$ – у здорових жінок.

Одним із факторів, які впливають на Т-лімфоцитів в ендометрії жінок з хронічним ендометритом може бути зниження концентрації лактобацил. Відомо, що лактобацили, індукуючи гіперчутливість, впливають на імунну систему і на резистентність до інфекції, що вказує на один із механізмів дії вказаних мікроорганізмів [14]. Зміни у Т-клітинній ланці імунітету можуть призвести до синтезу в ендометрії прозапальних цитокінів – IL-1, IL-6, TNF α [17].

Вивчення В-клітинної ланки імунітету в жінок з хронічним ендометритом виявило зниження рівня CD20-клітин (В-лімфоцитів), яке було в межах $(8,85 \pm 0,63)\%$ проти $(11,7 \pm 0,99)\%$ у здорових жінок. Розвиток хронічного ендометриту в жінок, який розвивався на фоні бактеріального вагінозу, супроводжувався більш значним зниженням рівня В-лімфоцитів в ендометрії з рівнем $(6,01 \pm 0,61)\%$ проти $(11,7 \pm 0,99)\%$ у контрольній групі (рис. 2).

Зміни відносної кількості субпопуляцій лімфоцитів у пацієнток з хронічним ендометритом свідчать про розвиток вторинної імунологічної недостатності, яка посилюється за наявності бактеріального вагінозу. Аналіз місцевого імунітету ендометрію показав, що вторинний імунодефіцит відбувається за імунохелперним варіантом, оскільки виявлено переважне зниження рівня CD4-лімфоцитів, унаслідок чого коефіцієнт CD4/CD8 мав тенденцію до зниження, що може свідчити

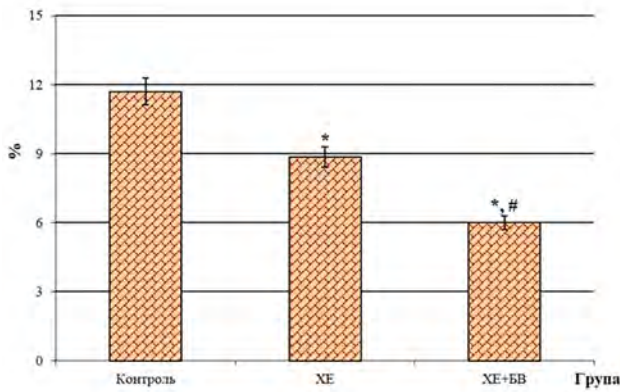


Рис. 2 – Рівень В-лімфоцитів в ендометрії жінок з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом

Примітки: К – здорові жінки (контроль); ХЕ – пацієнтки з вираженим хронічним ендометритом; ХЕ+БВ – пацієнтки, у яких хронічний ендометрит розвивався на фоні бактеріального вагінозу; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками здорових жінок, $p < 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи пацієнток, хворих хронічним ендометритом, $p < 0,05$.

про поступовий розвиток гіпохелперного варіанта вторинної імунологічної недостатності. Окрім того, знижується і рівень В-лімфоцитів.

З метою поглибленого вивчення гуморальної ланки місцевого імунітету ендометрія у жінок з хронічним ендометритом було вивчено показник рівня IgA.

Результати дослідження фактора гуморальної ланки місцевого імунітету в ендометрії показали зниження у 1,6 рази рівня IgA у жінок, хворих хронічним ендометритом у порівнянні з показником здорових жінок ($p < 0,05$) (рис. 3).

Зниження рівня IgA може посилювати розмноження та ріст умовно-патогенних та патогенних бактерій, оскільки IgA у нормальній концентрації викликає опсонізацію та аглютинацію мікроорганізмів, запобігає адгезії мікроорганізмів до епітелію, має бактеріостатичну дію, нейтралізує бактеріальні токсини [18].

Більш суттєве зниження IgA спостерігалось за умов хронічного ендометриту, який розвивався на фоні бактеріального вагінозу (рис. 3). Зниження рівня IgA вказує на недостатність місцевого гуморального імунітету за вторинним (набутим) механізмом.

Отже, у пацієнток з хронічним ендометритом в ендометрії відбувається розбалансування клітинної та гуморальної ланок імунного захисту, яке виражається підвищенням рівня Т-супресорів/кілерів з одночасним зниженням Т-хелперів, В-лімфоцитів та IgA. Зниження місцевого імунітету в ендометрії посилюється на фоні розвитку бактеріального вагінозу в жінок з хронічним ендометритом.

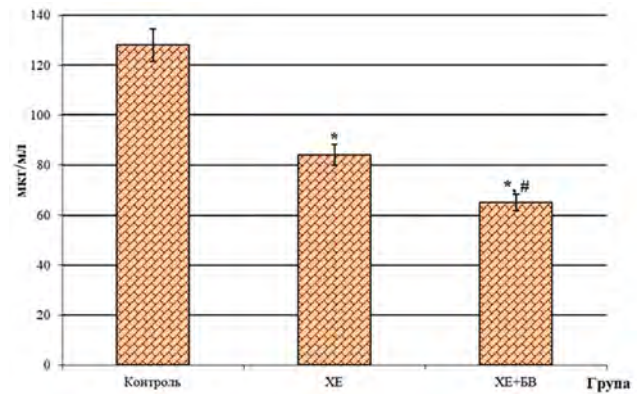


Рис. 3 – Рівень IgA в ендометрії жінок з хронічним ендометритом поєднаним із бактеріальним вагінозом

Примітки: К – здорові жінки (контроль); ХЕ – пацієнтки з вираженим хронічним ендометритом; ХЕ+БВ – пацієнтки, у яких хронічний ендометрит розвивався на фоні бактеріального вагінозу; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками здорових жінок, $p < 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи пацієнток, хворих хронічним ендометритом, $p < 0,05$.

Висновки

1. Мікрофлора порожнини матки у здорових жінок характеризується домінуванням *Lactobacillus spp.* і *Eubacterium spp.*. Розвиток хронічного запалення в ендометрії асоційований з підвищенням частоти детекції та кількісного вмісту *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, бактерій родини *Enterobacteriaceae*, з виявленням таких мікроорганізмів: *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*. Розвиток бактеріального вагінозу супроводжується виявленням в ендометрії нових видів мікроорганізмів – *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*
2. Дисбаланс мікрофлори ендометрію супроводжується достовірними порушеннями місцевого клітинного та гуморального імунного захисту ендометрію, який виражається зниженням рівня Т-хелперів, В-лімфоцитів та IgA з одночасним підвищенням Т-супресорів/кілерів у жінок з хронічним ендометритом. Встановлені зміни посилюються при бактеріальному вагінозі.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження характеру дисбактеріозу та стану місцевого імунітету в ендометрії жінок з хронічним ендометритом та бактеріальним вагінозом є перспективним для подальшого вивчення доцільності застосування при такій патології антибактеріальних та імунокоригувальних засобів.

References

1. Łaniewski P, Ilhan ZE, Herbst-Kralovetz MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. *Nat Rev Urol*. 2020;17(4):232-250. PMID: 32071434. doi: 10.1038/s41585-020-0286-z
2. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2018;110(3):327-336. PMID: 30098679. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.036
3. Molina NM, Sola-Leyva A, Saez-Lara MJ, Plaza-Diaz J, Tubić-Pavlović A, Romero B, et al. New opportunities for endometrial health by modifying uterine microbial composition: present or future? *Biomolecules*. 2020;10(4):593. PMID: 32290428. PMCID: PMC7226034. doi: 10.3390/biom10040593
4. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol*. 2017;595(2):451-463. PMID: 27373840. PMCID: PMC5233653. doi: 10.1113/JP271694
5. Ng QX, Peters C, Venkatanarayanan N, Goh YY, Ho CYX, Yeo WS. Use of *Lactobacillus* spp. to prevent recurrent urinary tract infections in females. *Med Hypotheses*. 2018;114:49-54. PMID: 29602464. doi: 10.1016/j.mehy.2018.03.001
6. Ravel J, Moreno I, Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2021;224(3):251-257. PMID: 33091407. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.019
7. Koedooder R, Mackens S, Budding A, Fares D, Blockeel C, Laven J, et al. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update*. 2019;25(3):298-325. PMID: 30938752. doi: 10.1093/humupd/dmy048
8. Li Y, Yu S, Huang C, Lian R, Chen C, Liu S, et al. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure. *Fertil Steril*. 2020;113(1):187-196.e1. PMID: 31718829. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.001
9. Alecsandru D, Garcia Velasco JA. The excessive presence (percentage or number) of endometrial immune cells in patients with chronic endometritis cannot be associated with reduced endometrial receptivity or recurrent pregnancy failure. *Fertil Steril*. 2020;113(1):85-86. PMID: 32033734. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.008
10. Lozano FM, Bernabeu A, Lledo B, Morales R, Diaz M, Aranda FI, et al. Characterization of the vaginal and endometrial microbiome in patients with chronic endometritis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;263:25-32. PMID: 34144490. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.05.045
11. Crha I, Ventruba P, Žáková J, Ješeta M, Pilka R, Lousová E, et al. Uterine microbiome and endometrial receptivity. *Ceska Gynekol*. 2019;84(1):49-54.
12. Moreno I, Simon C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertil Steril*. 2018;110(3):337-343. PMID: 30098680. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.041
13. Oliver A, LaMere B, Weihe C, Wandro S, Lindsay KL, Wadhwa PD, et al. Cervicovaginal microbiome composition is associated with metabolic profiles in healthy pregnancy. *mBio*. 2020;11(4):e01851-20. doi: 10.1128/mBio.01851-20
14. Escobar MF, Hincapie MA, Barona JS. Immunological role of the maternal uterine microbiota in postpartum hemorrhage. *Front Immunol*. 2020;11:504. PMID: 32296425. PMCID: PMC7137651. doi: 10.3389/fimmu.2020.00504
15. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells. *Front Immunol*. 2020;11:2025. PMID: 32973809. PMCID: PMC7461801. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025
16. Wang WJ, Zhang H, Chen ZQ, Zhang W, Liu XM, Fang JY, et al. Endometrial TGF-beta, IL-10, IL-17 and autophagy are dysregulated in women with recurrent implantation failure with chronic endometritis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019;17(1):2. PMID: 30606202. PMCID: PMC6317248. doi: 10.1186/s12958-018-0444-9
17. Tortorella C, Piazzolla G, Matteo M, Pinto V, Tinelli R, Sabbà C, et al. Interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor alpha in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. *Fertil Steril*. 2014;101(1):242-7. PMID: 24314919. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.041
18. Yang Y, Palm NW. Immunoglobulin A and the microbiome. *Curr Opin Microbiol*. 2020;56:89-96. PMID: 32889295. doi: 10.1016/j.mib.2020.08.003

UDC 618.12-002-036.12-036.838-06-07-085-059

State of Microflora and Degree of Expression of Local Immune Protection in the Endometry of Women with Infertility Developing on the Ground of Chronic Endometritis and Bacterial Vaginosis

Postolenko V. Yu., Avramenko N. V., Barkovskiy D. Ye.

Abstract. The purpose of the study was to evaluate the taxonomic profile of the microbiota and the state of local immunity in the endometrium of women with infertility under conditions of chronic endometritis combined with bacterial vaginosis.

Materials and methods. Diagnosis of chronic form of endometritis was performed on clinical symptoms, medical history, scraping, endoscopic and ultrasound examinations. All women were divided into three groups: Group I – 12 healthy women, who had no signs of chronic endometritis and formed a control group; Group II – patients with severe chronic endometritis (n = 16); Group III – patients with chronic endometritis developed on the background of bacterial vaginosis (n = 12).

Diagnosis of bacterial vaginosis in patients was performed by detecting an increase in the pH of vaginal secretions >4.5, the presence of homogeneous vaginal discharge with an unpleasant odor, detection of vaginal epitheliocytes with adherent gram-variable microorganisms, detection of «fishy» odor. The study was performed in the second phase of the menstrual cycle (day 18-23). Endometrial aspirate for the study of microflora was selected using a device for obtaining endometrial cytology Endobrash Standard for Endometrial Cytology.

Results and discussion. It was found that the development of chronic endometritis on the background of bacterial vaginosis increases the frequency of detection of opportunistic anaerobic microflora in the endometrium compared to women without bacterial vaginosis. It has been shown that a decrease in the level of T-helpers and an increase in the level of T-suppressors / killers in the endometrium are exacerbated in patients with chronic endometritis developed against the background of bacterial vaginosis. Thus, the level of CD4 + cells decreased by 1.6 times, and the level of CD8 + cells increased by 1.9 times compared to healthy women. Against this background, the level of B-lymphocytes and IgA in the endometrium of women with chronic endometritis and bacterial vaginosis decreased.

Conclusion. The development of chronic endometritis is associated with an increase in the frequency of detection and quantitative content in the endometrium of Streptococcus spp., Staphylococcus spp. The development of bacterial vaginosis is accompanied by the detection in the endometrium of new species of microorganisms – Prevotella spp., Mobiluncus spp.

The imbalance of the endometrial microflora is accompanied by significant violations of local cellular and humoral immune defense, which is expressed by a decrease in the level of T-helpers, B-lymphocytes and IgA with a simultaneous increase in T-suppressors / killers in women with chronic endometritis. The established changes amplify at a bacterial vaginosis.

Keywords: microflora, endometrium, chronic endometritis, bacterial vaginosis, infertility, local immunity.

ORCID and contributionship:

Viktoriiia Yu. Postolenko : 0000-0002-3805-371X^{A,B,C,D,E,F}

Nataliia V. Avramenko : 0000-0003-4403-2920^{A,B,D}

Dmitriy Ye. Barkovsky : 0000-0002-6806-7485^{A,B,C,F}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Viktoriiia Yu. Postolenko

Zaporozhzhia State Medical University

Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine Faculty of Postgraduate Study

26, Maiakovskiy Ave., Zaporozhzhia 69035, Ukraine

tel: +380677030220, e-mail: postolenko.vika@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 04.11.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування