



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН

Факултет „Медицина“

Катедра „Акушерство и гинекология“

Д-р Татяна Трендафилова Бодурска-Петкова

**Състав и характеристика на ендометриалния микробиом при
повтарящи се репродуктивни неуспехи**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по докторска програма „Акушерство и гинекология“

Плевен, 2024

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН

Факултет „Медицина“

Катедра „Акушерство и гинекология“

Д-р Татяна Трендафилова Бодурска-Петкова

**Състав и характеристика на ендометриалния микробиом при
повтарящи се репродуктивни неуспехи**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по докторска програма „Акушерство и гинекология“

Научни ръководители:

Доц. Д-р Тихомир Панков Тотев, д.м.

Доц. Д-р Емилияна Илиева Конова, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. Д-р Елена Димитрова Димитракова, д.м.

Доц. Д-р Мария Ангелова Ангелова, д.м.

Плевен, 2024

Дисертационният труд е написан на 181 стандартни страници и е онагледен с 45 фигури и 6 таблици.

Използваните литературни източници включват 267 заглавия на латиница.

Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не отговарят на номерата на фигурите и таблиците в дисертационния труд.

Авторът е докторант в самостоятелна форма на обучение в Катедра „Акушерство и гинекология“, Факултет „Медицина“, Медицински университет – Плевен и е зачислен със заповед № 3681/05.12.2022 г. Работи като акушер – гинеколог в МЦ КИРМ – Плевен.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани три пълнотекстови публикации.

Дисертационният труд е обсъден, приет и предложен за публична защита на заседание на Катедрен съвет на Катедра „Акушерство и гинекология“ при МУ – Плевен, състоял се на 30.04.2024 г.

Научно жури в състав:

Вътрешни членове за МУ – Плевен:

1. Доц. Д-р Петя Петрова Чавеева, д.м.
2. Доц. Д-р Никола Калинов Поповски, д.м.

Резервен вътрешен член за МУ - Плевен:

Доц. Д-р Кирил Георгиев Киров, д.м.

Външни членове за МУ – Плевен:

1. Проф. Д-р Елена Димитрова Димитракова, д.м., Медицински университет – Пловдив

2. Доц. Д-р Мария Ангелова Ангелова, д.м., Тракийски университет – Стара Загора

3. Доц. Д-р Весела Иванова Карамешева, д.м., Медицински университет – София

Резервен външен член за МУ – Плевен:

Доц. Д-р Кремен Цветанов Цветков, д.м., Медицински университет – Варна

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 8 Август 2024 г.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – Плевен.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение.....	5
II. Цел и задачи.....	5
III. Материали и методи	6
III.1. Дизайн на изследването и подбор на пациентките.....	6
III.1.1. Подбор на пациентките.....	6
III.1.2. Подготовка на пациентките.....	7
III.2. Използвани методи.....	7
III.2.1. Хирургичен метод.....	7
III.2.2. Молекулярно-диагностичен метод	9
III.2.3. Статистически метод.....	12
IV. Резултати, собствени проучвания и дискусия.....	12
IV.1. Основни характеристики на изследвания контингент	12
IV.2. Състав на ендометриалния микробиом в двете изследвани групи	14
IV.3. Възрастови изменения в количеството на лактобацилите.....	21
IV.4. Състав и честота на видовете еубиотичен и дисбиотичен ендометриален микробиом при пациентки с RIF (група 1) и RPL (група 2).....	29
IV.5. Характеристика на бактериалния състав по вид и честота на изолираните патогенни микроорганизми при дисбиотичен ендометриален микробиом.....	33
IV.5.1. Честота на патогени микроорганизми при RIF	36
IV.5.2. Честота на патогенни микроорганизми при RPL	38
IV.5.3. Честотно разпределение на видовете изследвани микроорганизми при умерено и силно нарушен микробиом	39
IV.6. Проучване на асоциацията на установените патогени с видовете нарушен микробиом	41

IV.7. Проучване подходите за изследване на ендометриалния микробиом и създаване на оптимизиран протокол за неговата оценка с помощта на геном-базирани технологии	42
V. Заключение – основни изводи.....	48
V.1. Заключение	48
V.2. Изводи	48
VI. Приноси	49
VI.1. Приноси с оригинален характер:	49
VI.2. Приноси с потвърдителен характер:.....	50
VII. Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд	50
VII.1. Публикации, свързани с дисертационния труд:	50
VII.2. Участия в научноизследователски проекти, свързани с дисертационния труд:	50
VII.3. Участия в научни форуми в България:	51
VII.4. Участия в научни форуми в чужбина:	51

I. Въведение

Инфертилитетът засяга между 8 и 12 % от двойките в репродуктивна възраст.

Въпреки, че технологиите за асистирана репродукция съществуват вече повече от 40 г., имплантацията остава последната и трудно преодолима бариера за настъпване и успешна бременност. Успеваемостта ѝ не преминава 40% за 5-дневни ембриони и 25% за 2 и 3-дневни ембриони.

Повтарящите се спонтанни аборти са един от най-предизвикателните проблеми в репродуктивната медицина, тъй като причините им често остават неизвестни, а ефективно лечение рядко е възможно. Патофизиологията на спонтанните аборти е многофакторна и често персистира като континуум, причиняващ нови аборти в последващите бременности. RPL засяга около 5% от жените в детородна възраст. Стандартните изследвания оставят около 50% от случаите без ясен отговор за загубата на бременността.

Развитието на новите молекулярно-генетични технологии направи възможно откриването на микроорганизми в считани за стерилни органи като матка, плацента, тестиси. В резултат се повдигна поредица от въпроси – кои са нормалните за ендометриума микроорганизми, как взаимодействат с физиологичните процеси в него, какво води до увреда на здравия микробиом, какви са последиците от увредата му, какви изменения се откриват най-често в микробиома при повтарящи се репродуктивни неуспехи, как да ги изследваме и третираме, какви източници на грешка съществуват – от пробовземане (техника и фаза на менструалния цикъл), контаминация, интерпретация на резултатите, изграждане на поведение, практическо приложение, биомаркер за изхода на ART.

Репродуктивните неуспехи могат да имат в основата си връзка с измененията на микробиома на репродуктивния тракт. Данните от последните години се фокусират върху микробиома на долния репродуктивен тракт, но сравнително слабо е проучен микробиома на горния репродуктивен тракт.

II. Цел и задачи

Репродуктивните неуспехи могат да имат в основата си връзка с измененията на микробиома на репродуктивния тракт. Данните от последните години се фокусират върху микробиома на долния репродуктивен тракт, но сравнително слабо е проучен микробиома на горния репродуктивен тракт. В тази връзка цел на настоящата дисертация е:

Цел: Да се приложи комплексен подход за начална оценка на състава и характеристиката на микробиома в ендометриума, да се потърси връзка с ролята му при пациенти с повтарящи се имплантационни неуспехи и повтарящи се спонтанни аборти и да се изгради протокол за неговото изследване, базиран на генни технологии, с приложение в клиничната практика.

Задачи:

Задача 1: Да се определи наличието и количеството на лактобацилите в ендометриума при пациентки с RIF (група 1) и RPL (група 2).

Задача 2: Да се анализира влиянието на възрастта върху количеството на лактобацилите в ендометриума при пациентки с RIF (група 1) и RPL (група 2).

Задача 3: Да се изследват състава и честотата на видовете еубиотичен и дисбиотичен ендометриален микробиом при пациентки с RIF (група 1) и RPL (група 2).

Задача 4: Да се характеризира бактериалния състав по вид и честота на изолираните патогенни микроорганизми при дисбиотичен ендометриален микробиом.

Задача 5: Да се анализира влиянието на изолираните дисбиотични микроорганизми върху степента на увреда на микробиома и да се сравни в двете изследвани групи.

Задача 6: Да се проучат подходите за изследване на ендометриалния микробиом и да се предложи създаване на оптимизиран протокол за неговата оценка с помощта на геном-базирани технологии.

III. Материали и методи

III.1. Дизайн на изследването и подбор на пациентките

III.1.1. Подбор на пациентките

Изследваният клиничен контингент включва 199 жени с RIF и RPL, диагностицирани, лекувани и проследени в МЦ КИРМ Плевен за периода м. октомври 2019 г. – м. ноември 2022 г. на средна възраст $35,69 \pm 5,16$ години. Използван е индуктивен подход за оценка на временния статус без да се търси връзка с последващи епизоди на RIF, RPL или живораждане.

Включващи критерии:

- пациентки с RIF и RPL;
- писмено дадено информирано съгласие за участие в проучването.

Исключващи критерии:

- липса на дадено писмено информирано съгласие;
- несанирани възпалителни процеси на влагалището и маточната шийка;
- налична и нелекувана патология на аднексите и матката;

- наличието на заболявания или медицински състояния, които застрашават здравето на пациентката;

- технически затруднено извършване на ендометриална биопсия поради анатомични особености.

Пациентките са инструктирани да се предпазват от бременност чрез въздържане от полови контакти или употреба на бариерни методи на контрацепция. Всички пациентки са предоставили писмено информирано съгласие за генетично изследване като част от одобрените стандартни оперативни процедури от всички участващи институции. При проучванията са спазвани стриктно принципите на Декларацията от Хелзинки. Анализите са извършени в условията на заслепяване на извършилия всички долуописани био-информативни анализи.

Включените в проучването случаи на пациенти с репродуктивни неуспехи отговарят на съвременните определения за RIF и RPL. Средната възраст на пациентките е 35,69±5,16 години в диапазона 24-54. Случаите са ретро- и проспективно проучени.

III.1.2. Подготовка на пациентките

При всички пациентки ендометриалната биопсия е назначена и проведена на 21-22-ри ден на спонтанен менструален цикъл без употребата на хормонални препарати. Подготовка на пациентките включва микробиологично изследване на влагалищно съдържимо в рамките на максимум 30 дни преди извършването на биопсията и PCR за *Mycoplasma/Ureaplasma spp.* от маточната шийка, проведено в рамките най-късно до 3 месеца преди биопсията, цитонамазка в рамките на предходната 1 година. В случаите на патологични находки от горните изследвания е проведено етиологично лечение с последващи контролни изследвания до санирането им. Пациентките с отклонения от цитологичното изследване не са включени в проучването преди установяване на точна диагноза и съответно лечение.

III.2. Използвани методи

III.2.1. Хирургичен метод

Биопсията на ендометриума се извършва в средна лутеална фаза-21-22-ри ден на спонтанен менструален цикъл. На всички пациентки е извършено

трансвагинално ултразвуково изследване за установяване на фазата на менструалния цикъл. Пациентките са асимптомни, без данни за актуален колпит или ендометрит. Ендометриални проби са взети от 103 пациентки (51,8%) с RIF (група 1) и 96 пациентки (48,2%) с RPL (група 2).

В процесът на получаване на ендометриална проба участват активно лекар акушер-гинеколог и акушерка. Всички манипулации са извършвани от двама лекари акушер-гинеколози от МЦ КИРМ „Света Елисавета“. Не се използва ултразвукова асистенция в процеса. Всички участници, вкл. пациентката, са с поставени маски на лицето. Персоналът използва powder-free стерилни ръкавици. Всички използвани инструменти са разопаковани от стерилни опаковки непосредствено преди манипулацията и са поставени върху стерилно поле. В литотомна позиция на пациентката след поставяне на стерилен спекулум се почистват обилно влагалище и маточна шийка с NaCl 0.9%, като се отстраняват максимално възможно влагалищно съдържимо и цервикална слуз. Не се прилага обработка на спекулум и влагалище с дезинфектанти. Пациентката не трябва да е провеждала специални хигиенни процедури, вагинални душове или прилагала локално медикаменти или пробиотични препарати. В маточната кухина се въвежда флексибилен катетър с двоен лумен “Intra-uterine Insemination Catheter 180 mm” (Wallace®, Cooper Surgical, Inc., Shelton, CT, USA). Чрез задаване на негативно налягане от монтирана на другия край на катетъра спринцовка с обем 1 ml и абразивни движения на катетъра в маточната кухина се абразира и аспирира маточна лигавица. Преди аспириране на ендометриално съдържимо не се извършва промиване на маточната кухина. Аспирацията се прекратява при обратното преминаване на катетъра на нивото на вътрешния отвор на цервикалния канал. С цел да се предотврати контаминация с влагалищно съдържимо се избягва всякакъв контакт на катетъра с влагалищните стени. За най-правилната интерпретация на получените резултати е необходимо пробата да съдържа голямо количество ендометриална лигавица. Оценката на количеството на пробата е правена субективно от извършващия я лекар и при съмнение за недостатъчно добит материал е извършвана повторна биопсия. Пробата трябва да съдържа минимум кръв и слуз. Последват внимателно и плътно затваряне на спруветката, съдържаща получения материал, маркирането ѝ и транспортирането ѝ до съответната лаборатория. Обработката на пробата се извършва в рамките на един час с цел запазване на нейния интегритет.

III.2.1.2 Протокол за съхранение на пробите

Аспирираната ендометриална лигавица се съхранява в NaCl 0.9% и се транспортира непосредствено след получаването ѝ в ДНК лаборатория. Пробата се хомогенизира с тъканен хомогенизатор DAKO Medimachine (Becton Dickenson, Heidelberg, Germany). След това хомогенизата се аспирира в стерилна спринцовка и се съхранява във физиологичен разтвор. Съхранена

във физиологичен разтвор пробата може да престои на температура между 2° С и 8° С не повече от 24 часа преди анализа. В случаите, в които пробата не може да бъде анализирана в рамките на 24 часа, се извършва замразяване на материала, който може да се съхранява при температура между -18° С и -22° С за 1 месец.

III.2.2. Молекулярно-диагностичен метод

III.2.2.1. ДНК екстракция

ДНК екстракцията се извършва с PREP-NA-PLUS реагент кит (DNA Technology LLC; Moscow, Russia), следвайки предписан протокол, който е осигурен от производителя.

III.2.2.2. Анализ на пробите

Всички проби се обработват с Femoflor® 16 REAL-TIME PCR Detection Kit, разработен от “DNA-Technology Research & Production” в Москва, Русия. Тестът използва полимеразоверижна реакция за намножаване на нуклеинови киселини за детекция на опортюнистична и нормална флора в урогенитални проби. Чувствителността на метода е 99%, специфичността е 93%. Чрез теста се прави количествена оценка на общата бактериална маса, на ендометриалната нормофлора - лактобацили, на комплекс от аеробни и анаеробни микроорганизми, на урогенитални микоплазми, гъби от род *Candida*, които могат да участват в развитието на дисбиотичен процес в микробиомния състав. Методът е приложим при различни популации и демографски групи, може да се използва в клинични и диагностични лаборатории на медицински институции или изследователски практики. Обработката на всички проби, ДНК-секвенирането и анализа на получените резултати са осъществени под директния контрол на микробиолог в МЦ КИРМ „Света Елисавета“ – Плевен.

III.2.2.3. Метод

Основава се на PCR амплификация на таргетни ДНК последователности. Femoflor 16 Real Time PCR Detection Kit се базира на флуоресцентна модификация на PCR метода. Интензивността на флуоресценцията се измерва на всеки цикъл от реакцията и се анализира със съответен софтуер.

Femoflor 16 Real Time PCR Detection Kit включва следните компоненти: за намножаване на тоталната бактериална маса, за намножаване на *Lactobacillus* spp. и за ДНК на опортюнистична флора.

Допълнително има PCR mix за човешка ДНК (sample intake control (SIC)), чрез който се изключва преаналитична грешка. При всеки анализ се взема предвид количеството на получения материал от маточната кухня. Ако количеството на събрания материал не е достатъчно за провеждане на анализа е необходимо повтаряне на процедурата по пробовземане.

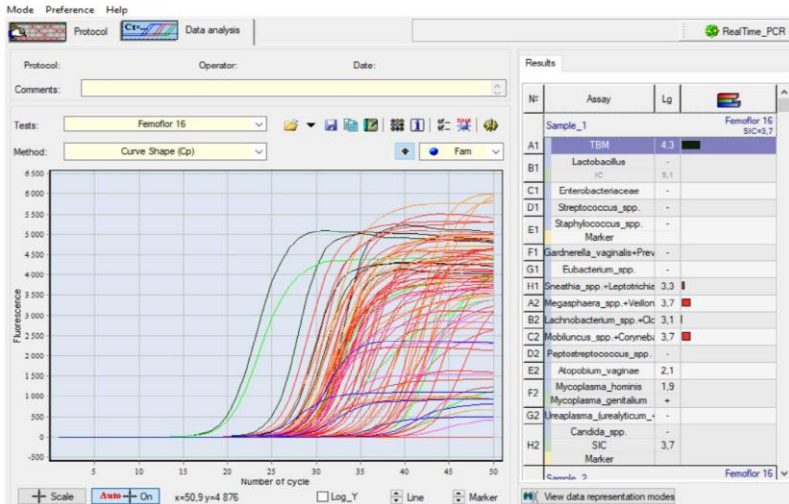
Методът има и вътрешен контрол (internal control (IC)), който има за задача да оцени качеството на полимеразо-верижната реакция.

След завършване на процеса софтуера изпълнява относителен количествен анализ на тоталната бактериална ДНК, на видово-специфичната ДНК на лактобацилите и на видово-специфичната ДНК на всеки опортюнистичен патоген или флора. За изключване на фалшиво-негативните резултати се взема предвид количеството на човешката ДНК (SIC).

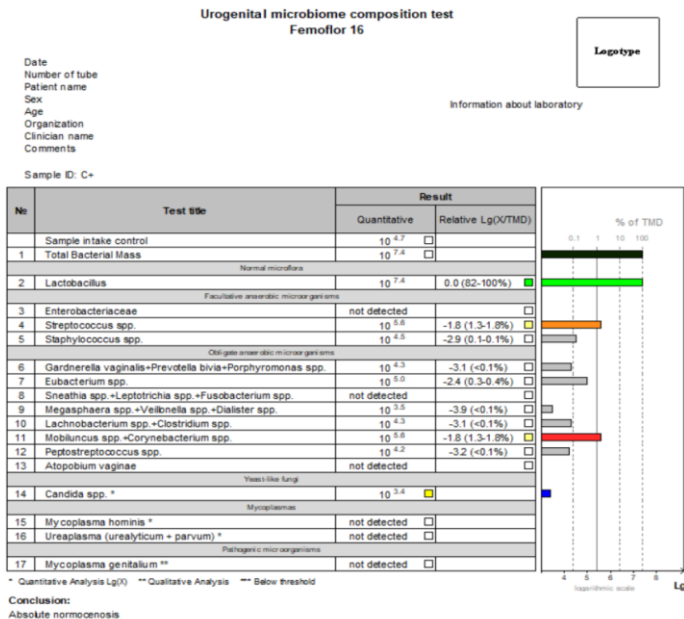
III.2.2.4. Анализ на данните

Регистрацията и интерпретацията на резултатите от PCR става в автоматичен режим. Идентификатора на пробата, тестовото име и резултата от всяко изследване (количество и диаграма, която позволява относително сравнение на нормалната флора и опортюнистични патогени във всяка проба) се изобразяват в дясната част на прозореца. Извършва се качествен анализ на патогените. Получената графика се изобразява в зависимост от флуоресцентния интензитет на броя на циклите за всяка епруветка.

To create a Specific report for Biocenose press the “Form the answer button”.



Фигура 1. Детекционни канали на амплифицираните продукти



Фигура 2. Примерни резултати при изследване с Femoflor 16

III.2.2.5. Спецификации

Специфичността на Femoflor 16 REAL-TIME PCR Detection Kit е оценена с биоинформационен анализ чрез налични онлайн бази данни с актуалната и изчерпателна към момента генетична информация. Специфичните олигонуклеотиди, които се използват в теста, са проверени чрез секвенции от база данни GenBank. Нито една от секвенциите не показва достатъчно сходство за неспецифична детекция.

III.2.3. Статистически метод

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0. и Excel на Office 2021. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0,05$.

Бяха приложени следните методи:

Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци.

Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

Вариационен анализ – изчисляване на оценките на централната тенденция и статистическо разсейване.

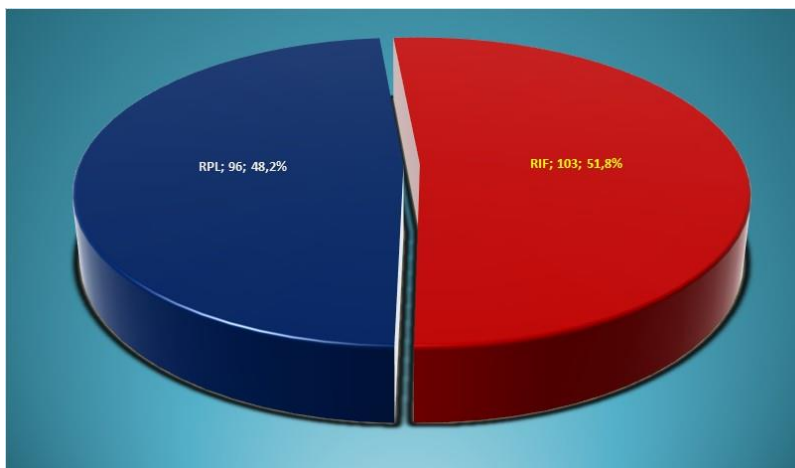
Fisher Freeman Haltonexact test, точен тест на Фишер и χ^2 - за проверка на хипотези за наличие на зависимост между категориен променливи.

IV. Резултати, собствени проучвания и дискусия

IV.1. Основни характеристики на изследвания контингент

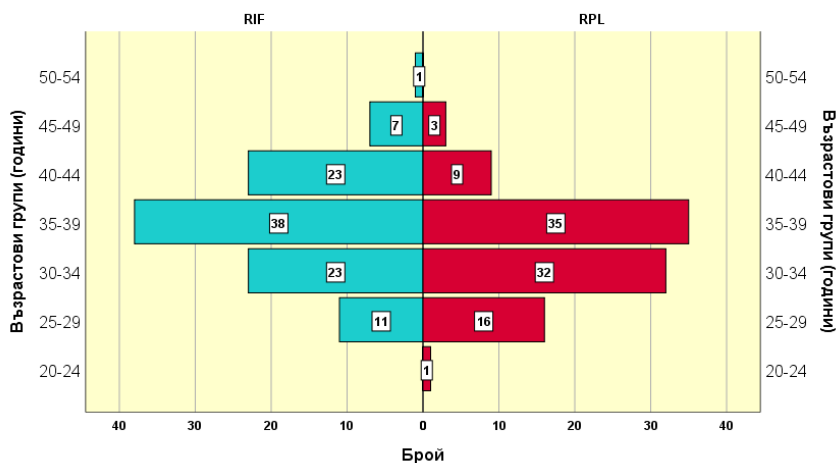
Направено е амбиспективно клинично-епидемиологично проучване обхващащо 199 пациентки на МЦ КИРМ „Света Елисавета“ – Плевен за периода октомври 2019 – ноември 2022 година. Изследвани са две основни групи, означени като RIF (recurrent implantational failure, повтарящи се имплантационни неуспехи) $n=103$ (51,8%) и RPL (recurrent pregnancy loss, повтарящи се спонтанни аборти) $n=96$ (48,2%) (фиг. 3).

Клиничният контингент е със средна възраст $35,69 \pm 5,16$ години в диапазона 24 – 54.

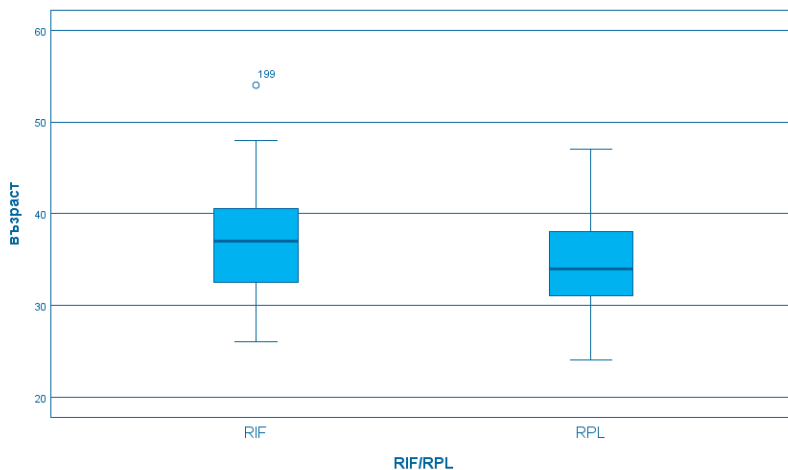


Фигура 3. Честотно разпределение на клиничния контингент по основни групи на изследване

Възрастовата група с най-голяма численост (38) при пациентките с RIF е 35-39 години, следвана от 30-34 и 40-44 години с по 23, а с най-малка (0) – 20-24 години. При жените с RPL най-голяма е числеността (35) на възрастова група 35-39 години, следвана от 30-34 години с 32 и с най-малка (0) – 50-54 години (фиг. 4).



Фигура 4. Разпределение на участниците в проучването по основни и възрастови групи



Фигура 5. Boxplot по възраст в двете изследвани групи

Средната възраст на пациентките при RIF е $36,91 \pm 5,35$ г., а при RPL е $34,39 \pm 4,63$ г. ($p=0.0005$) – групата на жените с RIF е средно с 2,5 г. по-възрастна.

IV.2. Състав на ендометриалния микробиом в двете изследвани групи

Имплантицията си остава един от най-неразрешените проблеми на асистираната репродукция в днешно време. Описва се като последна бариера за асистираните репродуктивни технологии (Edwards, 2006). RIF продължава да бъде проблем при 15% от пациентките и към момента са малко и ограничени възможностите за повлияването му (Busnelli et al., 2020).

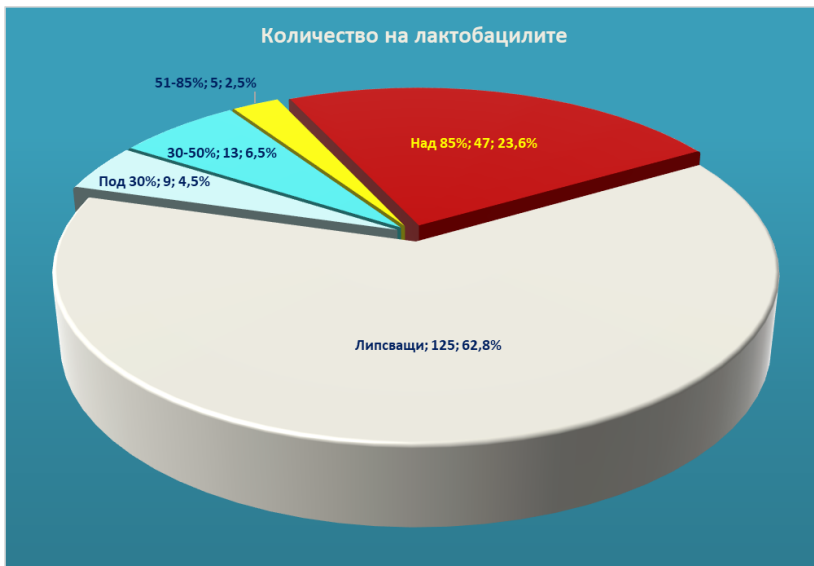
Лактобацилите са най-представените микроорганизми в женския генитален тракт. Тяхната способност да инхибират инфекция без да предизвикват възпаление може да подобри репродуктивния успех (Witkin & Linhares, 2017). Досега изследванията показваха, че вагиналната дисбиоза има негативна корелация с репродуктивните резултати при IVF (Naahr et al., 2016).

Затова си поставихме за задача да изследваме наличието и количеството на лактобацилите в ендометриума при повтарящи се репродуктивни неуспехи. В съответствие с актуалните литературни данни доказахме висок процент на отклонения от приетите за нормални концентрации на лактобацили. Само при една четвърт от случаите се установи нормална концентрация на лактобацили. В останалите 76,4% има значително нарушение в нормалния състав на микробиома.

На фиг. 6 е представено количеството на лактобацилите:

- С най-голям относителен дял (62,8%) са пациентките с липсващи такива, следвани от тези с нива над 85% (47 или 23,6%);
- Най-малко са имащите лактобацили в интервала 51-85% – 2,5%.

- Процентът на пациентките с намалено количество лактобацили е 13,5 от двете групи.



Фигура 6. Честотно разпределение на пациентките по количество на лактобацилите

Допълнително сравнихме нарушенията в количествата на лактобацилите в двете групи като резултатите от Табл. 1 и Фиг. 7 показват, че няма сигнификантна зависимост между количество на лактобацилите и принадлежността към основните групи – RIF и RPL. Тези данни са в подкрепа на общия патогенетичен механизъм на увреда на ендометриалната среда по отношение на имплантация и ранно развитие на бременност.

Таблица 1. Честотно разпределение на пациентките по количество на лактобацилите и основни групи ($p=0,926$)

Количество лактобацили	Честота	Общо	RIF	RPL
Липсващи	n	125	65	60
	%	62,8	63,1	62,5
Под 30%	n	9	4	5
	%	4,5	3,9	5,2
30 – 50%	n	13	6	7

	%	6,5	5,8	7,3
51 – 85%	n	5	2	3
	%	2,5	1,9	3,1
Над 85%	n	47	26	21
	%	23,6	25,2	21,9
Общо	n	199	103	96
	%	100,0	100,0	100,0



Фигура 7. Честотно разпределение на пациентките по количество на лактобацилите и основни групи

Първоначалните изследвания върху ендометриалния микробиом са силен пробив за разчупване на стереотипа за стерилност на матката. Хронологично разгледани, варират в двете крайности – от силни привърженици на доминирането на лактобацилите, създаващи маточна еубиоза до противопоставящи се на лактобацилите като условие за успешна бременност. Всички обаче са категорични по отношение на нейната нестерилност. Въпреки това все още няма ясна дефиниция и единно становище за ендометриална еубиоза.

Екипът на Fang (Fang et al., 2016) изследва ендометриален микробиом в здрави жени и изненадващо към това време установяват, че матката не е стерилна. Този колектив намира лактобацили в ендометриума едва в 6%. Тези

данни противоречат на възприетите по-късно за нормални високи нива на лактобацили за адекватна и здрава репродуктивна функция (имплантация, ранно развитие на бременността и живораждане). Тези начални трудове са отправна точка за всички последващи изследвания, разчупвайки приетата дотогава догма за стерилност на маточната кухина.

Franasiak и съавт. (Franasiak et al., 2016) намират доминиране на лактобацили при всички 35 изследвани пациентки, на които е проведена ин витро процедура, независимо от постигнатия резултат – живораждане или отрицателен тест за бременност.

При изследване на ендометриални проби на 13 фертилни жени Moreno и съавт. (Moreno et al., 2016) се установява отново доминиране на вида лактобацили. Това води до възникването на хипотезата за два възможни типа ендометриален бактериален състав: лактобацилус – доминиран микробиом с наличие на повече от 90% лактобацили от всички изолирани микроорганизми и не-лактобацилус – доминиран микробиом с наличие на по-малко от 90% лактобацили. Тази хипотеза се базира на имплантационните резултати в зависимост от количеството на лактобацилите. При микробиом с намалени под 90% лактобацили и превалиране на опортюнистични микроорганизми над 10%, сравнен с микробиом над 90%, нивата на имплантация са 23,1% срещу 60,7% ($p=0,02$), на бременност 33,3% срещу 70,6% ($p=0,03$), на развиваща се бременност 13,3% срещу 58,8% ($p=0,02$), на живораждане 6,7% срещу 58,8% ($p=0,02$).

Екипът на Moreno (Moreno et al., 2016) представя данни, според които половината от жените с репродуктивни неуспехи имат не-лактобацилус-доминиран ендометриум. Според този колектив репродуктивните резултати се различават с 30% между двата вида микробиом – лактобацилус-доминиран и не-лактобацилус-доминиран.

Нашите резултати се различават от тези на Moreno и съавт. в честотата на не-лактобацилус доминиран ендометриум – ние го установяваме в 76,4%, едва 23,6% от нашите жени са с нормален по критериите на Moreno и съавт. ендометриум. При това тези резултати са сходни в двете изследвани групи – RIF и RPL. Тези значими разлики в резултатите могат да се обяснят със строгите критерии на подбор и подготовка на пациентките за изследване. Друг възможен фактор на влияние, който не трябва да се пренебрегва, е хомогенния етнически произход на пациентките – всички са от българска етническа група. Тази висока честота на не-лактобацилус доминиран ендометриум в нашата група означава и висока честота на репродуктивни неуспехи в случай на липсваща диагностика и непроведено етиологично лечение.

Друг колектив (Kitaу et al., 2019) сравнява богатството и разнообразието на видовете микроорганизми в ендометриалния микробиом при пациенти с RIF и пациенти с инфертилитет без данни за RIF. Тяхното заключение е, че сред инфертилната популация, особено пациенти за IVF, по-рядко е налице лактобацилус-доминиран микробиом, както и статистически значим по-нисък процент на лактобацили.

Нашите резултати остават отново с висока честота на не-лактобацилус доминиран ендометриум, дори да се приложи cut-off от 80%, предложен от Kyono (Hashimoto & Kyono, 2019; Kyono, Hashimoto, Kikuchi, et al., 2018). Според този колектив бременност настъпва в 61,3% при лактобацили над 80% и в 40% при лактобацили под 80%.

По отношение на група 1 (RIF) нашите резултати съответстват на Ichiyama и съавт. от 2021 г. (Ichiyama et al., 2021), които при 145 пациентки с RIF намират липсващи лактобацили в $51,2 \pm 37,5\%$. В тяхното изследване е включена и контролна група здрави жени, при които лактобацили има само в 28,6%, а липсващи лактобацили в $51,6 \pm 38,3\%$, т.е. липсва статистически значима разлика между двете групи. Поради тази причина горните автори не приемат концепцията за лактобацилус-доминиран микробиом като биомаркер за имплантационен успех. Сходно мнение излага и колектива на Kyono 2019 г. (Kyono, Hashimoto, Kikuchi, et al., 2018) в свое изследване. По техни данни липсва разлика в резултата от IVF процедура при пациентки с лактобацилус-доминиран и не-лактобацилус доминиран микробиом. Затова те считат, че е необходимо да бъдат ревизирани референтните граници за лактобацили при фертилни жени в случаите когато наличието и количеството на лактобацилите се използва като биомаркер за имплантационен неуспех. На същото мнение е и колектива на Diaz-Martinez (Diaz-Martínez et al., 2021), който не намира разлика в репродуктивния резултат при пациентки с и без лактобацилус-доминиран микробиом. Поради тези причини много от изследователите започват да се фокусират върху патогенетично значими взаимодействия между ендометриалния микробиот и ендометриалния имунитет, а не просто потвърждение на наличието и изобилието или липсата на микроорганизми в матката.

Отново екипът на Moreno 2016 г. (Moreno et al., 2016) в същото изследване получава противоречиви резултати. При случаи на ендометриални полипи има голямо изобилие на лактобацили. Това предполага, че е необходим деликатен баланс в тяхното количество за създаване на еубиотичен микробиот, достатъчно стабилен и протектиращ дисбиоза с последваща асоциация с патологични състояния.

Подобно различие в резултатите от такива големи изследвания оставят силно дискутабилен въпроса за връзката между количеството на лактобацилите в ендометриума и успешния изход за една бременност. В тези случаи при интерпретацията на резултатите и обсъждането на поведение за допълнителни изследвания и лечение трябва да се има предвид хипотезата на колектива на Ravel, който предполага, че в отсъствието на патологични признаци, не-лактобацилус-доминиран микробиот може да се счита за нормален (Ravel et al., 2011). Тези разсъждения са в основата на последващи разработки и разглеждането на този тип микробиом като вариант на нормата.

Нашите резултати съответстват на тези на Vomstein от 2022 г. (Vomstein et al., 2022), който също установява намаление на лактобацилите при

пациентки с RIF и RPL. Този колектив провежда динамично изследване на ендометриалния микробиом в три времеви точки в рамките на менструалния цикъл при пациентки с RIF, RPL и контролна група здрави жени. Само в групата на здравите жени се наблюдава промяна в състава на ендометриалния микробиом под формата на стабилизиране с напредване на фазите на менструалния цикъл. Подобна пластичност на ендометриалния микробиом липсва при пациентки с RIF и RPL, което е в подкрепа на хипотезата за създаването от лактобацилите благоприятна ендометриална микросреда за имплантация и начално ембрионално развитие.

Cela и съавт. от 2022 г. (Cela et al., 2022) при пациентки с RIF установяват много различни от нашите резултати – използвайки cut-off от 90%, еубиоза има в 50% от изследваните жени, в другата половина е налице различно извено дисбиотично състояние, а при 20% от групата с дисбиоза лактобацили въобще не се откриват.

Колективът на Keburiya (Keburiya et al., 2022) при пациентки с RIF намира наличие на микрофлора в 89,2% от пробите с доминиране на лактобацилите. Според тези автори няма ясни доказателства, че наличието на лактобацилус-доминиран ендометриум има благоприятно влияние върху настъпването и изхода на бременността. Според тях обаче възстановяването на лактобацилното доминиране има позитивен ефект върху имплантацията. Те не намират влияние на опортюнистични бактерии върху нивата на бременност. Най-вероятно всичко това се дължи на факта, че маточния микробиот е набор от функционално асоциирани микроорганизми (Verstraelen et al., 2016). Определени микроорганизми в маточната кухина участват в поддържането на нейната хомеостаза в здраво състояние. Образуват биофилми, които са бактериални общности, играят важна роля, а бактериите в тях имат определени физиологични свойства. Нормалните биофилми в човешкото тяло са представени от микробни общности, които образуват физиологичната микрофлора на кожата, устната кухина, влагалището, червата. Образоването на патологични биофилми се асоциира с хронични възпалителни процеси. Тези автори установяват доста близки стойности на лактобацили при забременели и незабременели пациентки. В групата с първа IVF процедура лактобацилите са 80,0% при жените, които забременяват и 73,7% при незабременелите. В групата с RIF са съответно 90,2% и 79,0%. Техните резултати не подкрепят хипотезата за ролята на лактобацилите в процеса на имплантация и изхода от нея.

Всички тези данни от изследвания, някои от които крайно си противоречат, липсата на статистически доказателства, които да потвърдят влиянието на определени микроорганизми върху репродуктивния резултат, са достатъчно силен мотив за задълбочаване и разширяване на бъдещите проучвания. Не трябва да се оценява само наличието или липсата на определен микроорганизъм, а да се вземат предвид индивидуалното състояние на организма и взаимодействията на микроорганизмите в организма –

гостоприемник. За адекватното поведение спрямо пациентките с репродуктивни неуспехи от важно значение са както разбирането на същността на дисбиотичните процеси в матката и настъпването на хроничен възпалителен процес, така и навременното поставяне на правилна диагноза с подходящо лечение.

В резултатите на екипа на Lozano от 2023 г. (Lozano et al., 2023) при пациентки с RIF има по-ниско изобилие на лактобацили. Липсата или намалението на лактобацилите в тези случаи най-вероятно създава благоприятни условия за асцендиране на микроорганизми в матката с последващ негативен ефект за настъпване и развитие на нормална бременност, което поставя микробиома с ниска биомаса като потенциална входна врата за патогени. Kyono и съвт. (Kyono, Hashimoto, Nagai, et al., 2018) изнасят аналогични данни и намират, че не-лактобацилус доминиран микробиом се установява по-често при инфертилни японски жени. Ichiyama и съвт. (Ichiyama et al., 2021) при сравнение на вагиналният и ендометриалният микробиом при жени с RIF намират 30% не-лактобацилус доминиран микробиом. Важен резултат от това изследване е комбинацията между двете локализации – когато във влагалището се развие дисбиоза, тя настъпва и на ниво ендометриум. Повишаване на насищането на лактобацилите над 90% в ендометриума би могло да има благоприятен ефект при тези жени. Ендометриумът, доминиран от лактобацили, е по-рецептивен от този с ниско насищане на лактобацили и голямо разнообразие на микроорганизми. Поради тази генерална причина разбирането как да се изследва и третира микробиомната дисбиоза може да подобри репродуктивните резултати (García-Velasco et al., 2020).

В изследване от 2023 г. при 141 жени с RIF лактобацилус – доминиран микробиом е налице само при 20 пациентки, в останалите 121 лактобацилите липсват или са силно намалени (Zou et al., 2023).

Много сериозно основание за разсъждения и проучвания са резултатите на екипа на Fujii 2023 г. (Fujii & Oguchi, 2023). Те изследват връзката на ендометриалната рецептивност с количеството на лактобацилите в ендометриума. Изводът, който правят, е че намалението на лактобацилите, особено липсата им, се асоциира с изместване на имплантационния прозорец. Те смятат, че лактобацилите имат важно значение в подготовката на матката за имплантация и синхронизиране с предимплантационния ембрион.

Въпреки че пробовземането може да се отрази на получения резултат чрез вероятна контаминация от влагалище и цервикс, ние установяваме в голям процент липса на лактобацили в ендометриума – 62,8% от всички изследвани. Този резултат е в подкрепа на достоверността и надеждността на трансцервикалния достъп за изследване на ендометриалния микробиом.

Проучванията за ендометриалния микробиом при RPL освен оскъдни, са и с различен дизайн. Те обаче са много сходни на наличните данни от

пациентки с RIF, най-вероятно поради сходния патогенетичен механизъм на дисрупция на начална бременност – липса или намаление на лактобацилите и наличие на дисбиоза с патогенни микроби и голямо разнообразие на бактерии.

В нашите резултати при RPL лактобацилите са липсващи в 62,5%. В нормално количество са в 21,9%.

Колективът на Churchill (Churchill et al., 2018) при изследване на ендометриална течност в секреторна фаза при пациентки с RPL установяват в половината от случаите абнормен микробиом с голямо разнообразие на изолираните патогени. В тези случаи има комбинация с не – лактобацилус доминиран микробиом – лактобацилите варират между 12 и 68%. Доминиран от лактобацили микробиом има в половината от изследваните жени, което силно се различава от нашите резултати при такива пациентки – 21,9%.

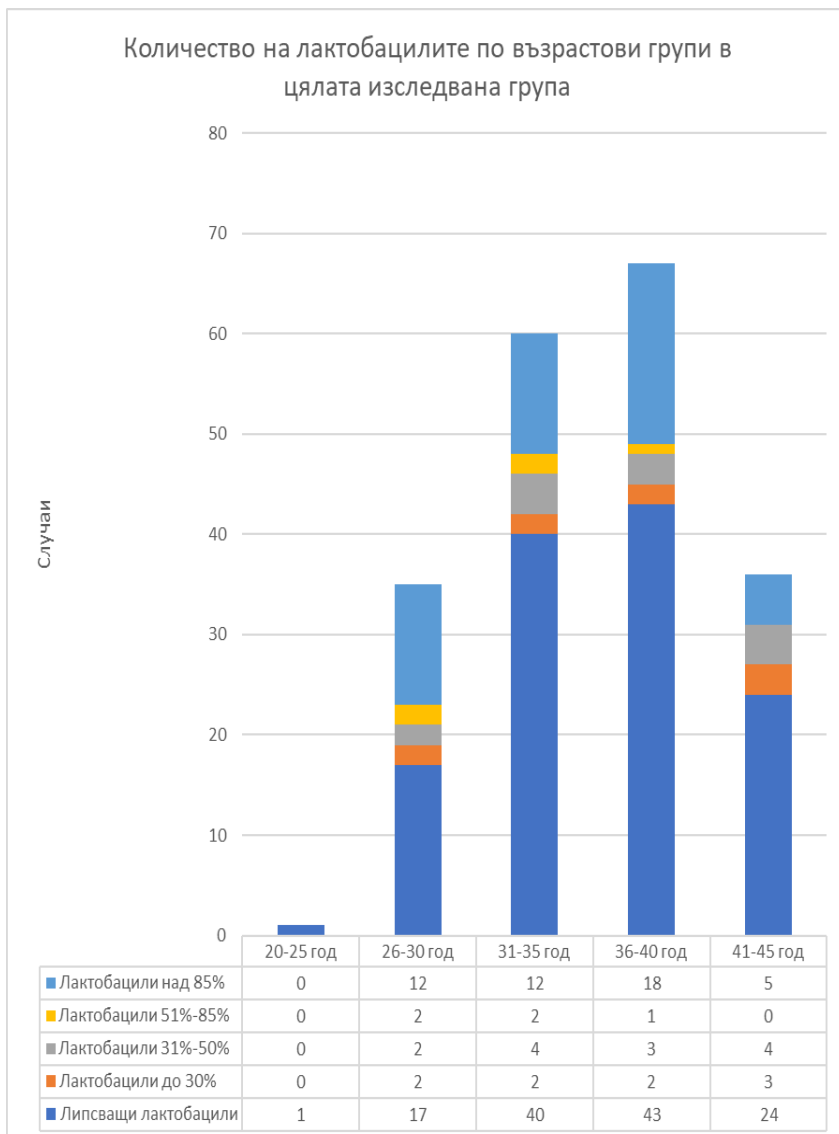
Varinova и колектив (Varinova et al., 2022) правят изследване на ендометриален микробиом при здрави фертилни жени и при жени с RPL. В RPL групата лактобацилите са най-изобилни в 30,3%. В групата на здрави фертилни жени в 29,4%. Липсва статистически значима разлика между двете групи. Техните резултати са в потвърждение на доминирането на лактобацилите, въпреки че това изобилие е под приетите 90%, включително в групата на здрави фертилни жени, но не могат да докажат негативния ефект на намалените лактобацили върху репродуктивния резултат.

IV.3. Възрастови изменения в количеството на лактобацилите

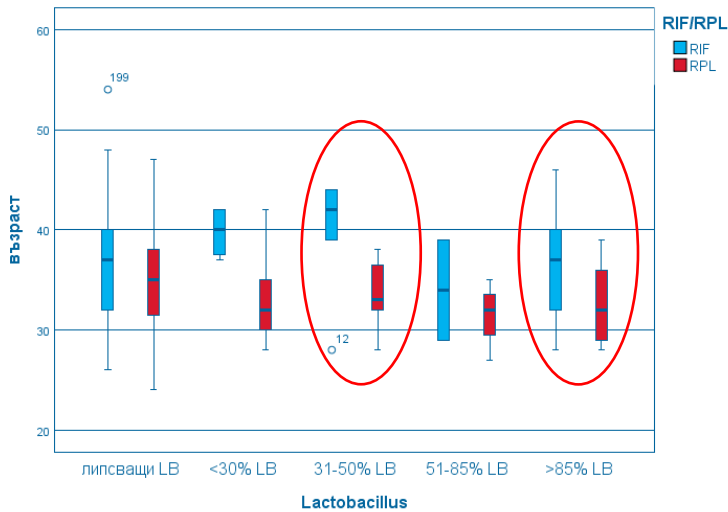
За да анализираме влиянието на възрастта върху ендометриалния микробиом, направихме проучване на количеството на лактобацилите по възрастови групи.

Възрастта е известен рисков фактор за увреда на еубиозата в гениталния тракт. Хормоналните изменения, които са в резултат на изчерпване на яйчниковия резерв, имат за последица хипоестрогенна среда, атрофия на лигавиците в репродуктивния тракт, промяна в рН, създаване на неблагоприятни условия за поселяване и поддържане с лактобацили и съответно развитие на други коменсални или опортюнистични бактерии.

От получените резултати в цялата група се потвърждава негативния ефект на възрастта върху лактобацилното насищане и доминиране. Най-висок е процентът на липсващи лактобацили във възрастта 41-45 г., 66,67%, а най-нисък във възрастта 26-30 г. – 48,57%. Тази група на млади пациентки е с най-висок процент на лактобацилус – доминиран микробиом -34,29%, сравнен с групата 41-45 г. – 13,89%.

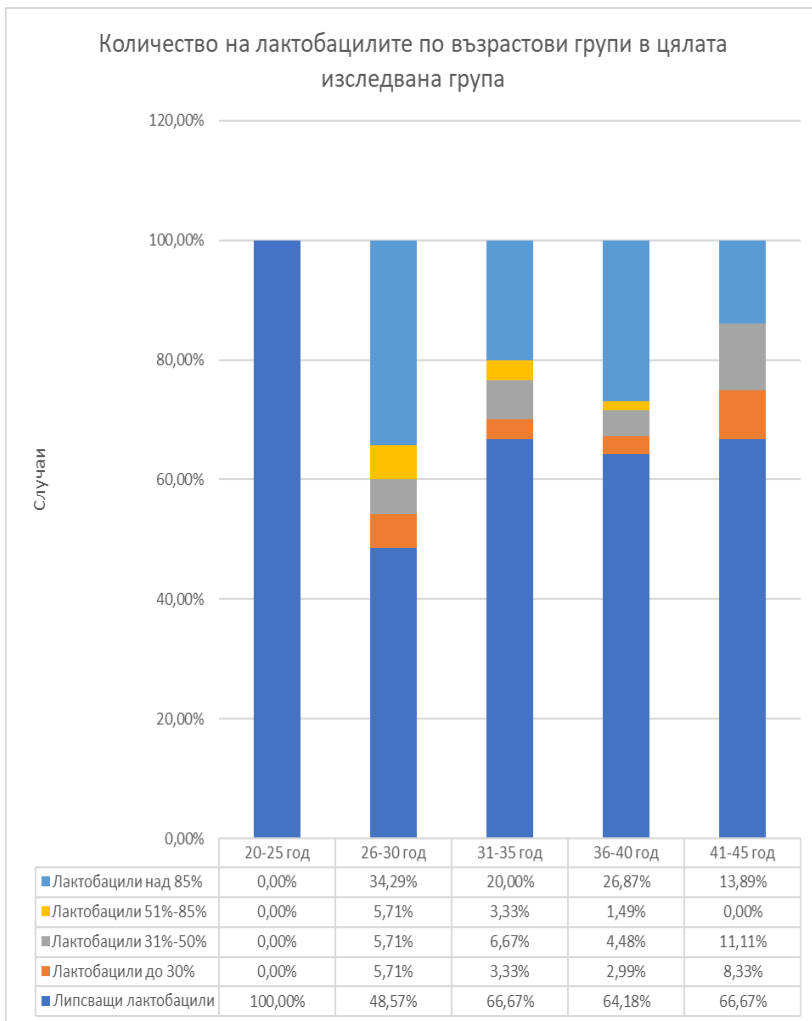


Фигура 8. Случаи на лактобацилус – доминиран и не-лактобацилус – доминиран ендометриален микробиом по възрастови групи.



Фигура 9. Boxplot на средната възраст на пациентките с RIF и RPL по количество на лактобацилите

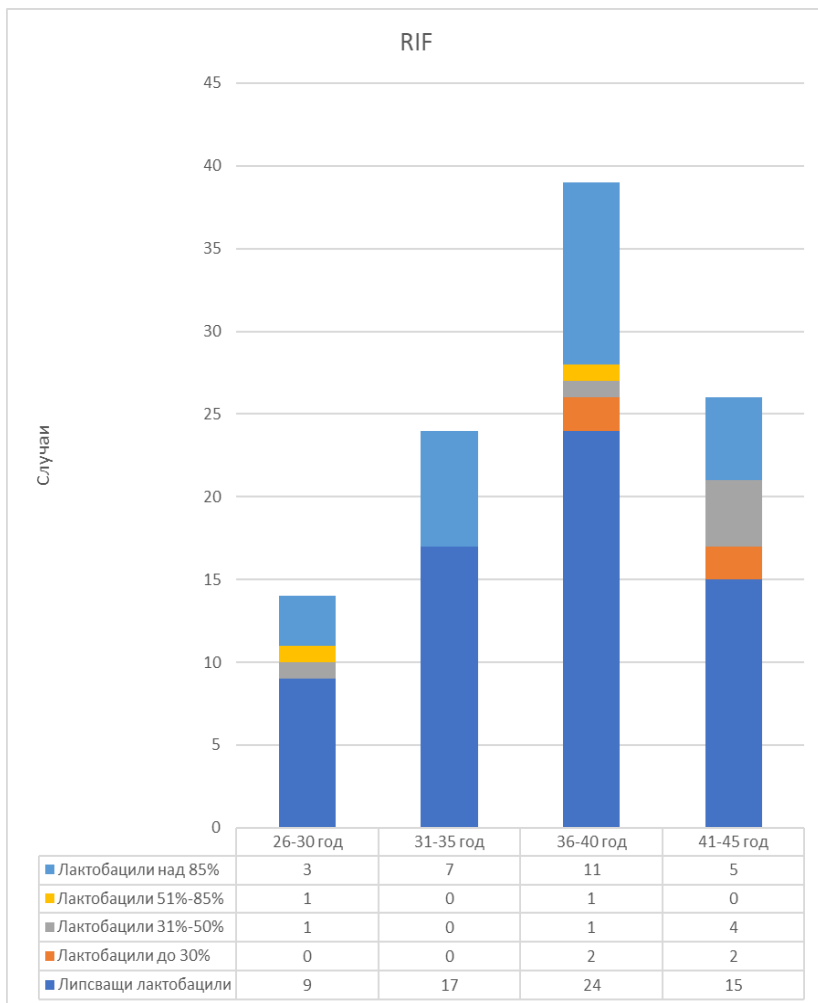
Статистически значима разлика в средната възраст между групите с RIF и RPL се намира при пациентките с 31-50% лактобацили и при пациентките с лактобацили над 85%, а именно пациентките с RIF и лактобацили 31-50% са със средна възраст 39.8+/-6 г., а тези с RPL и лактобацили 31-50% са със средна възраст 33.7+/-3.5 г. (p=0.046). За пациентките с RIF и лактобацили над 85% средната възраст е 36.4+/-4.8 г., а за RPL средната възраст е 32.5+/-3.5 г. (p=0.004).



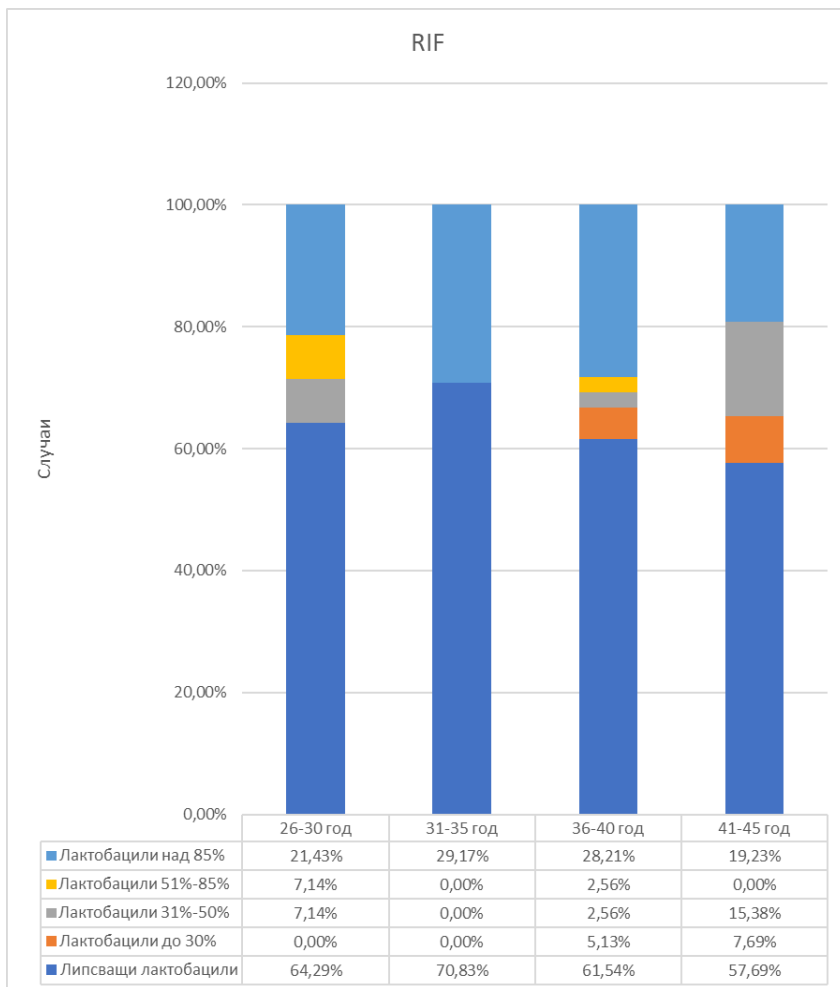
Фигура 10. Случаи на лактобацилулус – доминиран и не-лактобацилулус - доминиран ендометриален микробиом по възрастови групи представени в проценти.

Не се открива статистическа значимост в честотните разпределения на пациентите с RIF и RPL по отношение на групите с лактобацили в различните възрастови групи.

В групата на RIF най-висок е дела на лактобацилулус – доминиран микробиом в групата 31-35 г. – 29,17%, отново в тази възрастова група е най-висок процента на липсващи лактобацили – 70,83%. В останалите възрастови групи има различна степен на намаление на лактобацилите.

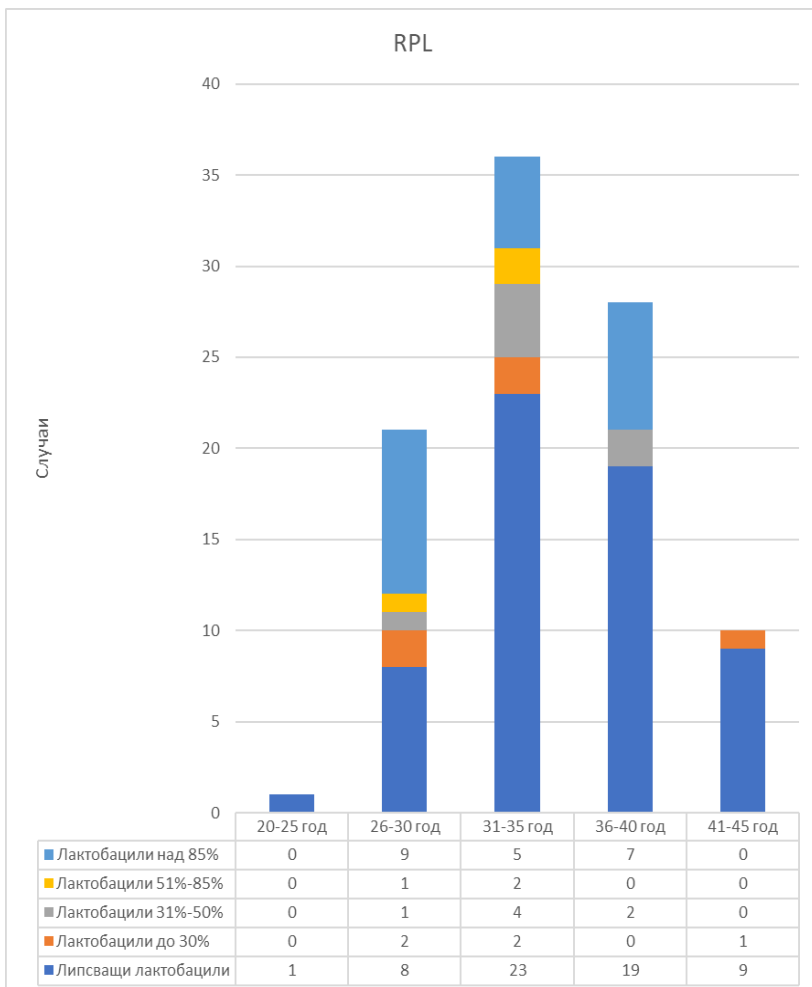


Фигура 11. Случаи на лактобацилулус – доминиран и не-лактобацилулус – доминиран ендометриален микробиом при пациентки с RIF.

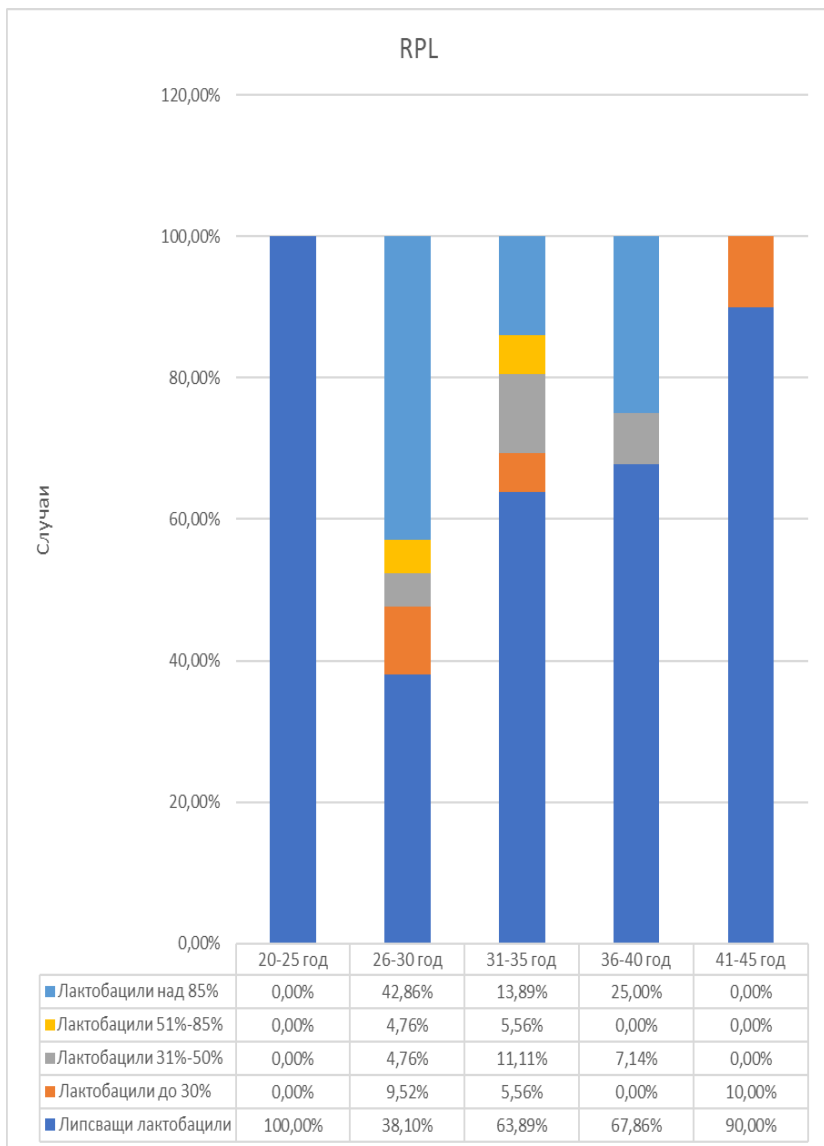


Фигура 12. Случаи на лактобацилулус – доминиран и не-лактобацилулус – доминиран ендометриален микробиом при пациентки с RIF представени в проценти.

В групата на RPL лактобацилулус – доминиран микробиом има най-висок процент във възрастта 26-30 г. – 42,86%, което е в голям контраст с възрастовата група 41-45 г. – 0%. Съответно в тази група липсващите лактобацили са в 90%, най-ниска е честотата на липсващи лактобацили в групата 26-30 г. – 38,1%.



Фигура 13. Случаи на лактобацилус – доминиран и не-лактобацилус – доминиран ендометриален микробиом при пациентки с RPL.



Фигура 14. Случаи на лактобацилус – доминиран и не-лактобацилус – доминиран ендометриален микробиом при пациентки с RPL представени в проценти.

Много изследвания дискутират влиянието на възрастта върху количеството на лактобацилите в ендометриума. Възрастта е известен фактор, който се асоциира с намаление на лактобацилното насищане и увеличаване на

микробното разнообразие в ендометриума с развитие на дисбиоза. Нашите резултати са сходни с наличната литература.

Колективът на Fujii (Fujii & Oguchi, 2023) изследва връзката на възрастта с ендометриалната рецептивност и количеството лактобацили. Те намират изместен имплантационен прозорец с напредване на възрастта. Тъй като напредналата възраст се съпровожда с намаление на лактобацилите, те считат, че лактобацилите са отговорни за подготовката на матката за имплантация. В тяхното изследване включените пациентки са на възраст до 41 г., липсва информация за лактобацилното насищане след тази възраст, с каквато ние разполагаме.

Колективът на Wang (Wang et al., 2021) прави по-широк анализ по възраст. Според тях лактобацилите са стабилни до около 40 годишна възраст, след което започват флукуации, и в периода 40+ до 60 г. претърпява значителна увреда. Изследването е проведено във фоликуларна фаза на менструалния цикъл и има включена контролна група здрави жени.

Екипът на Odawara (Odawara et al., 2020) прави изследване сред японски жени на факторите, които влияят на вътрематочния микробиот. Те намират сигнификантна разлика по отношение на възраст и раждане. При жените над 36 години има значително понижение на интраутеринните лактобацили, особено при раждали, сравнени с нераждали. Най-вероятните причини за това са две – нарушената цялост на маточната шийка при раждане, която става отворена врата за маточната кухина и постпарталната аменорея с ниски естрогенни нива, което благоприятства поселяване с бактерии, различни от лактобацилите. В нашето изследване не сме направили анализ на влиянието на предходни раждания, аборти, кюретажи и други вътрематочни манипулации, вкл. ембриотрансфер и вътрематочна инсеминация, които биха могли да бъдат отговорни за нарушаване на естествената бариера за асцендиране на микроорганизми от влагалището.

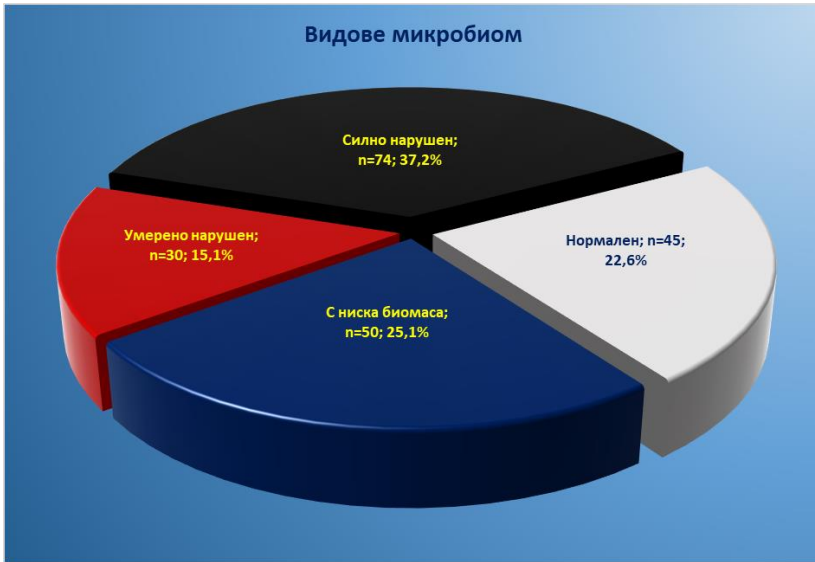
IV.4. Състав и честота на видовете еубиотичен и дисбиотичен ендометриален микробиом при пациентки с RIF (група 1) и RPL (група 2)

За да анализираме получените резултати дефинирахме четири типа ендометриален микробиом съобразно актуалните опити за класифицирането му. За нормален микробиом приемаме наличието на повече от 90% лактобацили без дисбиотични бактерии. Микробиом с ниска биомаса – липсват лактобацили, липсват дисбиотични бактерии. Умерено нарушен микробиом – лактобацили под 90% с наличие на дисбиотични бактерии над 10%. Силно нарушен микробиом – липса на лактобацили, наличие на дисбиотични бактерии над 10%. Към настоящия момент първите два типа микробиом се приемат за нормални.

От фиг. 15 става ясно, че при видовете микробиом:

- Най-много (74 или 37,2%) са имащите силно нарушен такъв, следвани от имащите от вида с ниска биомаса (25,1%);

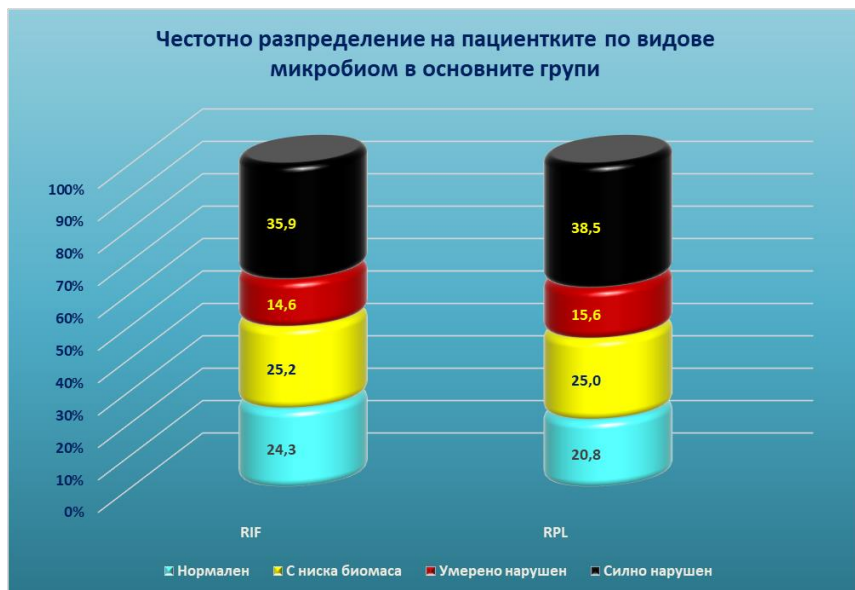
- Най-малко (15,1%) са имащите умерено нарушен.
- Нормален микробиом има в 22,6% от пациентките.



Фигура 15. Честотно разпределение на пациентките по видове микробиом

Таблица 2. Честотно разпределение на пациентките по видове микробиом в цялата извадка и по основни групи (p=0,942)

Видове микробиом	Честота	Общо	RIF	RPL
Нормален	n	45	25	20
	%	22,6	24,3	20,8
С ниска биомаса	n	50	26	24
	%	25,1	25,2	25,0
Умерено нарушен	n	30	15	15
	%	15,1	14,6	15,6
Силно нарушен	n	74	37	37
	%	37,2	35,9	38,5
Общо	n	199	103	96
	%	100,0	100,0	100,0



Фигура 16. Честотно разпределение на пациентките по видове микробиом в основните групи

Сравнителният анализ на двете основни групи по видовете микробиом (Табл. 2 и Фиг. 16) показва, че няма сигнификантна зависимост между тях ($p=0,942$).

В група 1 (RIF) в 50,9% има нарушен микробиом – силно и умерено нарушен, а в група 2 (RPL) такива са налице в 54,1%.

В своето оригинално изследване от 2016 година екипът на Морено (Moreno et al., 2016) предлага разделянето на ендометриалния микробиом лактобацилус – доминиран и не-лактобацилус – доминиран. Приемат границата от 90% за разграничаването им. Във втората група микробиом има различна концентрация на лактобацили с различни комбинации от видове патогенни и опортюнистични микроби. Поради малкия брой на включените за изследване пациентки, те не успяват да направят допълнително класифициране на тези различни варианти. В това свое изследване те правят връзка на не-лактобацилус – доминиран ендометриум с негативния резултат за настъпване на бременност и като възможна причина обсъждат създаването на инфламаторна среда в матката при липса на лактобацили. Те обаче правят много общ анализ – не разглеждат допълнително наличието, количеството и видовете на останалите видове бактерии – патогени и комменсали при не-лактобацилус – доминиран ендометриум.

Според най-новите изследвания по темата започва да се налага мнение за наличието на патогенни микроби в матката, които имат неблагоприятен ефект,

а не толкова наличие на определен бактериален таксон, който би имал позитивен ефект върху репродукцията. Това мнение се подкрепя от резултатите на Moreno (Moreno et al., 2021), според които липсата на бактерии, вкл. на лактобацили се асоциира с положителен резултат. Те установяват 49% живораждания в групата без бактерии, вкл. лактобацили, сравнено с 40,5% в групата с налични бактерии. Това би могло да означава, че при липса на патогенни микроби, лактобацилите не са необходими за имплантацията и да се въведе съществуването на втора група микробиом, вариант на нормата – микробиом с ниска биомаса. Друг извод, който този колектив прави, е че състава на микробиома по време на концепцията е асоцииран с репродуктивния резултат. Доминирането на лактобацили има негативна корелация с патогенни микроорганизми и позитивна корелация с коменсални микроорганизми. Това може да бъде важно за поддържане на стабилността в екосистемата. Авторите считат, че ролята на лактобацилите в репродукцията се състои в предотвратяване на колонизацията на маточната кухина от патогенни бактерии. Тези данни за асоциация на лактобацилите и патогенните микроби се демонстрират и в нашето изследване – в групата на RIF доказваме 35,9% силно нарушен микробиом с липсващи лактобацили и висок процент патогенни микроби, в групата на RPL този процент е 38,5.

Cariati и съавт. (Cariati et al., 2023) правят изследване на ендометриалния микробиом при инфертилни жени и сравняват резултатите между забременели и незабременели жени. В групата на забременелите в 33,3% липсват бактерии, вкл. лактобацили. В нашето изследване, без обаче да сме проучили репродуктивния резултат, липсващи лактобацили има в 25,1% - групата на микробиома с ниска биомаса.

Iwami и съавт. (Iwami et al., 2022) при изследване на ендометриален микробиом при 195 пациентки с RIF намират дисбиоза в 48,9%, лактобацилус-доминиран микробиом в 51,1%. От тези 48,9% при 22,9% има силно нарушен микробиом, в 17,6% умерено нарушен, в 8,4% микробиом с ниска биомаса. Тези резултати се различават от нашите, които са съответно: 37,2%, 15,1%, 25,1%, сходство има само по отношение на умерено нарушен микробиом. Според нашите резултати нормален микробиом има в 22,6%, т.е. два пъти по-малко. В изследването на Iwami са включени само пациентки с RIF, докато в нашето изследване има и група на пациентки с RPL. Ние обаче не установяваме статистически значима разлика във видовете микробиом между RIF и RPL, поради което не можем да отдадем тези несъответствия на различния профил на включените за изследване пациентки.

В нашето изследване разделяме резултатите в 4 основни групи – на лактобацилус-доминиран микробиом и 3 групи на не-лактобацилус – доминиран ендометриум: с ниска биомаса, умерено нарушен и силно нарушен микробиом. В наличната литература успяхме да открием сходни на нашите резултати само в изследването на колектива на Iwami от 2022 г. Това подразделяне на видовете микробиом е удобно и ефективно за клиничната

практика, защото предоставя яснота за микробиомния състав на ендометриум, степента на неговата увреда, необходимостта от лечение или контролно изследване след проведено лечение. В този смисъл е ефективен биомаркер за прогноза на ART процедура. Преценката обаче за лечение винаги трябва да бъде строго индивидуална, обсъдена с пациентката и съобразена с нейната репродуктивна и хронологична възраст.

При около половината от пациентките с RIF и RPL може да се очаква различна по степен редукция до пълна липса на лактобацили, а в другата половина наличие на патогенни микроби с различно изразена дисбиоза. Според Iwami (Iwami et al., 2022) само 23% биха имали нужда от антибиотично лечение за нормализиране на лактобацилното съдържание и концентрация в ендометриума. При това не се препоръчват курсове на лечение повече от 8-10 дни поради негативния ефект върху лактобацилите от дългите курсове. Персонализирането на нуждата от антибиотично лечение според получения резултат RT-PCR, както и избора на антибиотик, само и когато е необходимо, намалява употребата на широкоспектърни антибиотици и развитието на антибиотична резистентност. Въпросът с корекцията на дисбиотичния ендометриум остава отворен откакто се използват секвениращите техники. Два са основните подхода за възстановяване на еубиоза – антибиотици (системно или локално) и пробиотици. Повсеместната употреба на антибиотици носи рискове освен от развитие на антибиотична резистентност и от увреда на нормалния микробиом, не само ендометриален. Затова приложението на антибиотици „на сляпо“, базирано само на секвениращите резултати не може да бъде благоприятна перспектива за лечение на ендометриална дисбиоза. Приложението на пробиотици може да бъде обещаващ и мотивиран метод за корекция на дисбиозата. Две основни теории са възприети за поселяване на ендометриума с микроби – асцендиране от влагалище и хематогенна дисеминация от устна кухина и черва. Сходството в микробиомите на репродуктивния и гастроинтестиналния тракт са основание за разработване в бъдеще на т.нар. микробни транспланти.

Дали микробиомът е новата надежда в репродуктивната медицина е под въпрос към настоящия момент. В бъдеще ще има повече яснота до каква степен се простира влиянието му върху репродуктивния резултат – имплантация, начална бременност, раждане, и как микросредата може да бъде модулирана до желано състояние.

IV.5. Характеристика на бактериалния състав по вид и честота на изолираните патогенни микроорганизми при дисбиотичен ендометриален микробиом

Анализирахме дисбиотичния състав на нарушения микробиом, който показва най-често срещаните микроорганизми, а така също и влиянието им върху степента на нарушение в двете изследвани групи.

Според количеството микроорганизми в цялата извадка (фиг. 17, табл. 3):

- Най-много (116 или 58,3%) са от *Fungi Candida spp.*, следвани от ОАНМ *Atopobium vaginae* с 30,7% и ОАНМ *Mobiluncus spp. plus Corynebacterium spp.* с 22,1%. В настоящия труд не се разглежда влиянието на микобиома върху репродуктивните неуспехи, поради което липсва и по-нататъшна дискусия върху установения вид кандида.

- Най-малко са от вида Pathogenic microorganisms *Mycoplasma genitalium* – 0%.

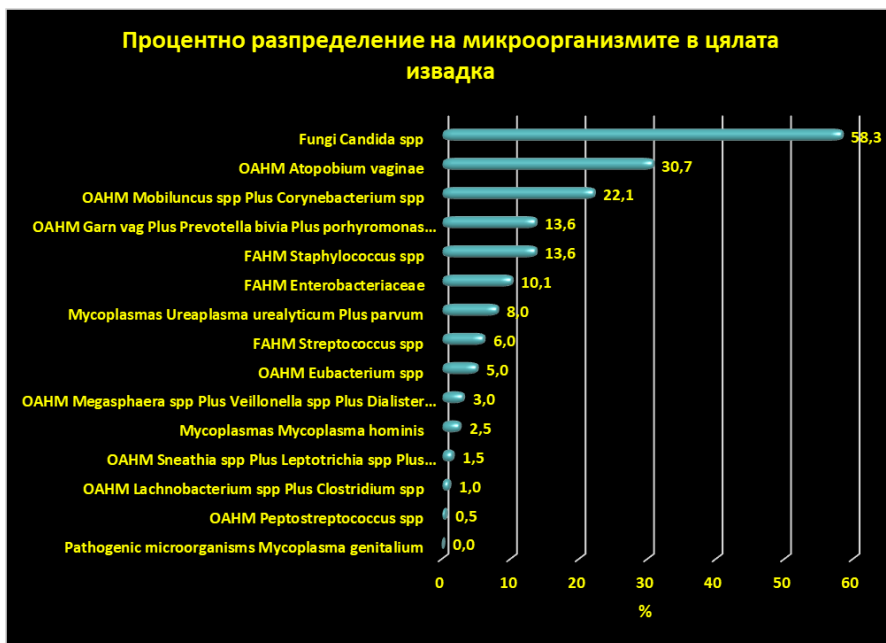
Сравнителният анализ на основните групи по наличието на изследваните микроорганизми показва, че (табл. 3):

- Статистически значима разлика се установява при три от микроорганизмите - ФАНМ *Staphylococcus spp.* ($p=0,021$), ОАНМ *Megasphaera spp. plus Veillonella spp. plus Dialister spp.* ($p=0,029$) и *Fungi Candida spp.* (при последния разликата е с гранична сигнификантност – $p<0,1$).

- ОАНМ *Megasphaera spp. plus Veillonella spp. plus Dialister spp.* е със статистически достоверно по-голям относителен дял в групата RIF, а другите два – в групата RPL.

- По отношение на гъби се установява тенденция за по-високи стойности в групата с RPL ($p<0.087$), макар и не с висока статистическа значимост.

- При останалите микроорганизми разликата между основните групи е статистически нищожна.



Фигура 17. Честотно разпределение на изследваните микроорганизми в цялата извадка

Таблица 3. Честотно разпределение на изследваните микроорганизми в цялата извадка и основни групи

Микроорганизми	Чес тога	Общо	RIF	RPL	P
FAHM	n	20	9	11	0,639
<i>Enterobacteriaceae</i>	%	10,1	8,7	11,5	
FAHM	n	12	6	6	1,000
<i>Streptococcus spp.</i>	%	6,0	5,8	6,3	
FAHM	n	27	8	19	0,021
<i>Staphylococcus spp.</i>	%	13,6	7,8	19,8	
ОАММ <i>G.vaginalis</i> plus <i>Prevotella bivia</i> plus <i>Porphyromonas</i> <i>spp.</i>	n	27	13	14	0,836
	%	13,6	12,6	14,6	
ОАММ	n	10	6	4	0,749
<i>Eubacterium spp.</i>	%	5,0	5,8	4,2	
ОАММ <i>Sneathia</i> <i>spp.</i> plus <i>Leptotrichia spp.</i> plus <i>Fusobacterium</i> <i>spp.</i>	n	3	1	2	0,610
	%	1,5	1,0	2,1	
ОАММ	n	6	6	0	0,029
<i>Megasphaera spp.</i> plus <i>Veillonella spp.</i> plus <i>Dialister spp.</i>	%	3,0	5,8	0,0	
ОАММ	n	2	2	0	0,498
<i>Lachnobacterium</i> <i>spp.</i> plus <i>Clostridium spp.</i>	%	1,0	1,9	0,0	
ОАММ <i>Mobiluncus</i> <i>spp.</i> plus <i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>	n	44	18	26	0,124
	%	22,1	17,5	27,1	

ОАММ	n	1	1	0	
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	%	0,5	1,0	0,0	1,000
ОАММ <i>Atopobium vaginae</i>	n	61	32	29	
	%	30,7	31,1	30,2	1,000
<i>Fungi Candida spp.</i>	n	116	54	62	
	%	58,3	52,4	64,6	0,087
<i>Mycoplasmas Mycoplasma hominis</i>	n	5	3	2	
	%	2,5	2,9	2,1	1,000
<i>Mycoplasmas Ureaplasma urealyticum plus parvum</i>	n	16	8	8	
	%	8,0	7,8	8,3	1,000
Pathogenic microorganisms	n	0	0	0	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	%	0,0	0,0	0,0	-

IV.5.1. Честота на патогени микроорганизми при RIF

Честотата на хроничния ендометрит в общата популация е оценена на 19% (Yoshii et al., 2013) и 45% в инфертилна популация (Kushnir et al., 2016). Тази висока честота е свързана предимно с повтарящи се имплантационни неуспехи (recurrent implantation failure, RIF) и повтарящи се загуби на бременността (recurrent pregnancy loss, RPL), отколкото с други причини за инфертилитет (Johnston-MacAnanny et al., 2010), (Yang et al., 2014), (Cicinelli et al., 2015), (Cicinelli et al., 2014). Поради тази висока честота и тихия, безсимптомен ход на хроничния ендометрит, очакваме в резултатите установяване на патогенни микроби, които се асоциират с него. Дисбиозата в долния генитален тракт, която е източник на бактерии за асцендиране към матката в комбинация с намаление на ендометриалните лактобацили, създават подходящи условия за висока честота на ендометриална дисбиоза и хронично възпаление на маточната лигавица.

При пациентки с хроничен ендометрит Liu и съавт. установяват по-висока честота на *Dialister*, *Prevotella*, *Gardnerella* и *Anaerococcus*, което съответства и на нашите резултати (Liu et al., 2019). Тези данни са в подкрепа на хипотезата, че микробния дисбаланс може да отключи патологичен имунен отговор с увреда на ендометриалната рецептивност и последващ RIF (P. Chen

et al., 2021). Дисбиотичният вагинален микробиом и асоциирания про-инфламаторен отговор може да увреди цервикалната епителна бариера, като по този начин да позволи транслокация на патогенни бактерии към ендометриума с последващ локален възпалителен процес (Borgdorff et al., 2016). Този резултат силно корелира с установения от нас – всички случаи на наличие на *Dialister* са само при пациентки с RIF. *Prevotella bivia* принадлежи към групата на микроорганизмите, които имат негативен отпечатък върху човешката репродукция (Campisciano et al., 2021).

Колективът на Ichiyama (Ichiyama et al., 2021) през 2021 г. прави анализ на 145 пациентки с RIF и 21 здрави контролни жени. В групата с RIF се установяват 14 различни рода микроби: *Atopobium*, *Megasphaera*, *Gardnerella*, *Prevotella*, *Schlegelella*, *Delftia*, *Burkholderia*, *Sphingobacterium*, *Dietzia*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Rlstonia*, *Leucobacter* и *Hydrogenophaga*. Разликата с контролната здрава група е сигнификантна. От тези 14 рода *Atopobium*, *Gardnerella*, *Prevotella* и *Megasphaera* са същите, които асоциират патологичния вагинален микробиом с RIF, т.е. могат да асцендират от влагалището и да имат негативен ефект върху ендометриума и връзка с RIF. Вагиналната дисбиоза с патогенни бактерии (*Atopobium*, *Gardnerella*, *Prevotella* и *Megasphaera*) предполага наличието и на ендометриална дисбиоза с вагинален произход. Същите тези бактерии ние установяваме в голяма честота при нашите пациентки с RIF. Тъй като ендометриалната биопсия е инвазивна и носи риск от асцендиране на инфекция, а получаването на вагинална проба е лесно и възпроизводимо, в някои случаи изолирането на тези бактерии може да се използва като биомаркер за RIF. Този подход може да се използва в определени случаи – технически затруднения, финансови ограничения, индивидуални предпочитания.

Diaz-Martinez и съавт. (Diaz-Martínez et al., 2021) при 48 пациентки, провеждащи IVF процедура, наблюдават негативна асоциация на *Streptococcus* и *Prevotella* с репродуктивния резултат и позитивна асоциация на лактобацилите. В нашата извадка *Streptococcus* има честота 6% в двете изследвани групи, а *Prevotella* 13,6%.

Zou и съавт. (Zou et al., 2023) при 141 жени с RIF доказват в 88,7% патогенни бактерии, най-чести от които са *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria* и *Klebsiella*. Известно е, че тези патогени увреждат интегритета на ендометриалния епител, което може да бъде причина за неуспешна имплантация (Cicinelli et al., 2015). Zou и колектив (Zou et al., 2023) потвърждават този факт, след провеждане на антибиотично лечение има значително повишение на нивата на имплантация. В нашето изследване *Staphylococcus* и *Gardnerella* са с честота 13,6% в двете изследвани групи, а друг облигатен анаероб – *Atopobium*, се доказва в 30,7% от цялата извадка.

Сравнявайки резултатите от IVF процедури при „наивни“ IVF пациентки и пациентки с RIF с установените микроорганизми в ендометриалния

микробиом Keburiya и съавт. (Keburiya et al., 2022) не намират разлика в крайния резултат, въпреки че при първата група има по-висока честота на *Gardnerella vaginalis* (12,8% срещу 1,6% при RIF). Във втората група с RIF тези автори намират облигатни анаероби (*Streptococci*, *Enterobacteriaceae*), но в ниски концентрации, които са несигнификантни.

Cela и съавт. (Cela et al., 2022) при изследване на ендометриален микробиом при пациентки с RIF установяват в 50% от случаите дисбиоза, като използват cut-off от 90%. Най-често изолираните от тях патогенни микроорганизми са *Streptococci* и *Gardnerella vaginalis*.

Колективът на Iwami (Iwami et al., 2022) отново доказват като най-чести патогени *Streptococci* и *Gardnerella vaginalis* при пациентки с RIF. След провеждане на антибиотично лечение нивата на бременност са 64,5% срещу 33,3% в контролната нелекувана група.

Lozano и съавт. (Lozano et al., 2023) при пациентки с RIF потвърждават отново *Streptococci* и *Gardnerella vaginalis* като най-честите патогени в ендометриума. Статистически значими други патогенни бактерии в тяхното изследване са *Prevotella*, *Bifidobacterium* и *Dialister*. Освен доказването им, авторите намират негативна връзка между тях и лактобацилите. Този резултат е в потвърждение и на други изследвания, които асоциират наличието на патогенни микроби с лош репродуктивен резултат.

Cariati и съавт. (Cariati et al., 2023) изследват ендометриален микробиом преди ембриотрансфер и сравняват резултатите с репродуктивния резултат. В групата на забременелите има сигнификантна разлика в изолирането на бактерии от семейства *Staphylococcaceae* (8% срещу 35% при незабременелите) и *Enterobacteriaceae* (60% срещу 100% при незабременелите).

IV.5.2. Честота на патогенни микроорганизми при RPL

Churchill и съавт. (Churchill et al., 2018) в ендометриална течност в лутеална фаза при пациентки с RPL в половината от жените детектират *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Clostridiales*. Във всички тези случаи се наблюдава комбинирано наличие на патогени и намаление на лактобацилите между 12 и 68%.

Peuranpää и съавт. (Peuranpää et al., 2022) при RPL наблюдават намаление на ендометриалните лактобацили и повишение на *Gardnerella*. Те правят подробен анализ на видовете лактобацили в ендометриума при RIF. Според тях *L.crispatus* е намален, подобно намаление се намира и при хроничен ендометрит (Liu et al., 2019). *L. iners* е най-доминиращия микроб в техните проби. Доста изследвания асоциират *L.iners* с дисбиоза (Petrova et al., 2017) и лоши репродуктивни резултати, вкл. субфертилитет (Campisciano et al., 2021), спонтанни аборти (Nasioudis et al., 2017), преждевременно раждане (Kindinger

et al., 2017). В техните резултати има асоциация между вагиналната и ендометриална колонизация с *Gardnerella vaginalis*. Известен факт е нейната връзка със спонтанните аборти – ранни (Haahr et al., 2019), и особено късни (Leitch & Kiss, 2007). При жени с RPL и вагинална колонизация с *Gardnerella vaginalis* има по-високи нива на периферни NK клетки, което може да обясни връзката на дисбиотичния микробиот на репродуктивния тракт с възпалението и спонтанните аборти (Kuon et al., 2017).

При пациентки с RPL Shi и съвт. (Shi et al., 2022), освен намаление в лактобацилите в ендометриума, намират че наличието на *Gardnerella* се асоциира с преждевременно раждане в последваща бременност, а относителното доминиране на *Ureaplasma spp.* е независим рисков фактор за спонтанен аборт на хромозомно нормална бременност и рисков фактор за преждевременно раждане.

Fen-Ting и кол. (Fen-Ting et al., 2022) при изследване на ендометриум при пациентки с RPL установяват значително намаление на лактобацилите и превръщане на маточната кухина в мултимикробна среда. Доминира типа *Proteobacteria*, който включва *Acinetobacter*, *Hydrogenophilus*, *Schlegelella*, *Serratia*, *Delftia*. Вместо *Lactobacillus* *Acinetobacter spp.* става преобладаващ вид в ендометриума.

Всички тези изследвания, провеждани в последните 5 години, имат много сходни резултати – асоциация на конкретни патогени с лош репродуктивен резултат. Нашите резултати съвпадат в голяма степен с изводите, които са направени до момента. Те са в потвърждение на ролята на определени бактериални видове в развитието на дисбиоза, която може да бъде негативен участник в патогенезата на репродуктивните неуспехи.

IV.5.3. Честотно разпределение на видовете изследвани микроорганизми при умерено и силно нарушен микробиом

Според анализа на честотното разпределение на изследваните микроорганизми при умерено и силно нарушен микробиом (табл. 4):

Статистически достоверна разлика се установява при 4 от микроорганизмите: *Staphylococcus* (p 0,049), ОАНМ *Gardnerella vaginalis* plus *Prevotella bivia* plus *Porphyromonas spp.* (p 0,002), ОАНМ *Mobiluncus spp.* plus *Corynebacterium spp.* (p 0,046), *Mycoplasmas*, *Ureaplasma urealyticum* plus *parvum* (0,036), като техния дял е по-висок в групата с умерено нарушен микробиом. В групата със силно нарушен микробиом е налице тенденция близка до сигнификантната за повишена честота на ФАНМ *Enterobacteriaceae* (p 0,056). От получените резултати не може да бъде установен дисбиотичен микробиотичен организъм, който да бъде сигнификантно асоцииран със силно нарушен микробиом. Липсва статистически значима разлика между двете изследвани групи по отношение на останалите изолирани микроорганизми.

В съответствие с (Moreno et al., 2021) и ние установяваме негативна връзка между лактобацилите и факултативни и облигатни анаероби – *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Gardnerella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Mobiluncus* и *Corynebacterium*, като тази негативна връзка е най-силно изразена при *Enterobacteriaceae*.

Таблица 4: Честотно разпределение на изследваните микроорганизми при умерено и силно нарушен микробиом

Микроорганизми	Честота	Умерено нарушен	Силно нарушен	P
FAHM	n	2	17	0,056
<i>Enterobacteriaceae</i>	%	6,7	23,0	
FAHM <i>Streptococcus</i> spp.	n	5	7	0,321
	%	16,7	9,5	
FAHM <i>Staphylococcus</i> spp.	n	12	15	0,049
	%	40,0	20,3	
ОAHM <i>G.vaginalis</i> plus <i>Prevotella bivia</i> plus <i>Porhyromonas</i> spp.	n	14	12	0,002
	%	46,7	16,2	
ОAHM <i>Eubacterium</i> spp.	n	4	6	0,469
	%	13,3	8,1	
ОAHM <i>Sneathia</i> spp. plus <i>Leptotrichia</i> spp. plus <i>Fusobacterium</i> spp.	n	2	1	0,199
	%	6,7	1,4	
ОAHM <i>Megasphaera</i> spp. plus <i>Veillonella</i> spp. plus <i>Dialister</i> spp.	n	3	3	0,352
	%	10,0	4,1	
ОAHM <i>Lachnobacterium</i> spp. plus <i>Clostridium</i> spp.	n	1	1	0,496
	%	3,3	1,4	
ОAHM <i>Mobiluncus</i> spp. plus <i>Corynebacterium</i> spp.	n	17	25	0,046
	%	56,7	33,8	
ОAHM <i>Peptostreptococcus</i> spp.	n	1	0	0,288
	%	3,3	0,0	

ОАНМ <i>Atopobium vaginiae</i>	n	15	38	1,000
	%	50,0	51,4	
<i>Fungi Candida spp.</i>	n	24	51	0,336
	%	80,0	68,9	
<i>Mycoplasmas Mycoplasma hominis</i>	n	2	3	0,625
	%	6,7	4,1	
<i>Mycoplasmas Ureaplasma urealyticum plus parvum</i>	n	7	5	0,036
	%	23,3	6,8	
Pathogenic microorganisms	n	0	0	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	%	0,0	0,0	

IV.6. Проучване на асоциацията на установените патогени с видовете нарушен микробиом

Според нашите резултати при умерено и силно нарушен микробиом статистически достоверна разлика се установява при 4 групи от микроорганизмите: *Staphylococcus spp.*, ОАНМ включващи *Gardnerella*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, ОАНМ включващи *Mobiluncus spp.* и *Corynebacterium spp.*, *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. Измененията са по-изразени при умерено нарушен микробиом. При силно нарушен микробиом е налице тенденция близка до сигнификантната за повишена честота на *Enterobacteriaceae*. От тези резултати не може да се направи извод за дисбиотичен микроорганизъм, който сигнификантно да се асоциира със силно нарушен микробиом. Тези резултати са сходни с получените от Moreno (Moreno et al., 2021). Техните данни са за негативна корелация на лактобацилите с *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и позитивна корелация с коменсални микроби, поддържайки по този начин стабилността на системата. Техният последващ анализ на живоражданията показва негативна корелация със *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Staphylococcus*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Klebsiella* и *Escherichia*. Пациентките с живораждания имат по-голямо изобилие на лактобацили, сравнени с останалите – с намалени или с налични дисбиотични микроби. Според тяхната хипотеза състава на микробиота при пациентки с живораждания е физиологичен сценарий и не повлиява функционалния репродуктивен потенциал. В нашето изследване намираме аналогична корелация на горе – изложената: изчерпването и намалението на лактобацилите водят до създаването на среда, която благоприятства развитието на патогенни микроби. В случая може да се дискутира и обратния

сценарий – наличието на патогени не благоприятства присъствието и доминирането на лактобацили.

Екипът на Cela (Cela et al., 2022) намира сигнификантно повишени проинфламаторни интерлевкини при дисбиоза в резултат от *Streptococci* и *Gardnerella vaginalis*. Те асоциират наличието на тези конкретни патогени в ендометриума и настъпилата от тях дисбиоза с развитието на имунна дисрегулация. Според тях доминирането на лактобацилите в ендометриалния микробиот е от ключово значение за поддържане на физиологична невъзпалена микросреда с правилно активиране на локалния имунен отговор, създаващ максимално добри условия за имплантация. При установена дисбиоза се променя метаболомния и протеомния състав на ендометриума. Налице са изменения в процесите свързани с имунния отговор, възпалението и клетъчната адхезия, както и промяна в естествено налични антимикробни пептиди, които инхибират растежа на различни патогени. Kyono и съавт. (Kyono, Hashimoto, Nagai, et al., 2018) и Moreno и съавт. (Moreno et al., 2016) дефинират две групи - на еубиоза и на дисбиоза. За състояние на еубиоза те определят 80% доминиращ от лактобацили или бифидобактерии микробиом. В групата с дисбиоза най-представените родове са *Atopobium*, *Gardnerella* и *Streptococcus*, без да се установява ефект в техните пропорции върху процента на бременност (Hashimoto & Kyono, 2019).

По-разширени бъдещи изследвания ще могат да установят по-точно кой е водещия механизъм във взаимодействията между микроорганизмите и как тези взаимодействия влияят на организма – гостоприемник.

IV.7. Проучване подходите за изследване на ендометриалния микробиом и създаване на оптимизиран протокол за неговата оценка с помощта на геном-базирани технологии

Въпреки първоначалните окуражителни данни за наличието на ендометриален микробиом, някои изследвания поставят под съмнение това и дават много противоречиви заключения. Притесненията за достоверността на резултатите са от различно естество – от реагенти, малки или хетерогенни кохортни групи, демографски характеристики до начини на вземане на пробата, секвениращи методи с последваща обработка и интерпретация на резултатите.

Едно от най-големите притеснения е по отношение контаминация на пробата. В настоящата налична литература липсва точно описание на начина на получаване на материал и избягване на неговата контаминация. Контаминацията може да бъде от различно естество – от влагалище и цервикс при трансцервикален достъп до ръкавици на персонала, кожа на пациента, маточни манипулатори, цервикални дилататори при трансабдоминален достъп (Baker et al., 2018).

Други затруднения, относно адекватната интерпретация на получените резултати, произхождат от групите пациенти, които са включени в изследванията – матки от хистеректомия по повод гинекологично заболяване, доброкачествено или злокачествено, тъй като естествено здрави матки не могат да бъдат отстранени, както и IVF пациенти, които въпреки че нямат тежко заболяване, са с инфертилитет и не могат да бъдат използвани за контроли.

Специфични праймери за 16S rRNA gene V region са потенциална причина за несъответствие, тъй като могат да подценят или надценят определени таксони (Tremblay et al., 2015). Друг източник на вариации в изследванията са използваните методи за ДНК екстракция и класификацията на таксономните единици (Sinha et al., 2015).

Въпреки различните данни, съставът на ендометриалния микробиом е доста неизяснен и неговата роля остава поле за дебати (Baker et al., 2018), (Simon, 2018), (Peric et al., 2019). Темата е доста противоречива, недостатъчно и пълноценно проучена и отваря възможност за задълбочени и по-широки изследвания. Липсват големи кохортни изследвания, ограничени от инвазивността на изследването, липсва сравняемост на получените резултати. Належащо е създаването на стандартни протоколи за пробовземане и обработка и анализ на резултатите. Малкият брой на включените в наличните изследвания пациенти има директен негативен ефект върху статистическата сила на анализа. Поради своята инвазивност провеждането на изследване при здрави контроли остава предизвикателство.

Едно от големите ограничения в обработката на резултатите е подбора на пациентите за изследване. Характеристики на пациента – възраст, етнос, сексуално поведение, хормонално, антибиотично, пробиотично лечение, трябва да се вземат предвид при селекцията на кохортата, тъй като тези фактори могат да доведат до големи флукутации в получените резултати с последваща двойственост.

Освен междуиндивидуалните особености трябва да се имат предвид и индивидуалните характеристики на включените пациенти – менструален цикъл, индикация за изследването, провеждане на ART процедура. В зависимост от фазата на менструалния цикъл се установяват изменения в състава на ендометриалния микробиом. При ART изследването на микробиома би трябвало да се проведе в условия, еквивалентни на имплантационния период с цел избягване на двойственост при интерпретация на резултатите вследствие на хормоналните флукутации.

По отношение на получените резултати трябва да се имат предвид и външни фактори. При пациентките с RIF и RPL по-често се извършват вътрематочни манипулации – дилатации, кюретажи, ембриотрансфери, хистероскопии. Тези манипулации могат да доведат до директна инокулация и поселяване на ендометриума с вагинална и цервикална флора, включително патогенна.

Една от темите, които трябва да бъде по-детайлно проучена и изяснена е какво представлява нормалния микробиом. В цитираните по-горе изследвания установения чрез секвениране микробиом при здрави жени варира значително сред отделните автори. Към момента с наличните данни е трудно да се изгради консенсус за здрав или ядрен, сърцевинен микробиом.

Маточната микросреда е уникална за разлика от други мукози по това, че е мястото на ембрионална имплантация и плацентация и е под строгия контрол на женските полови хормони. Затова за разлика от влагалището лактобацилите не могат да се използват като критерий за маточно здраве. Освен това те могат да отключат поредица от патофизиологични изменения след асцендиране към кухината (Baker et al., 2018).

Наличието на маточен микробиом може да увреди геномната стабилност на маточния епител чрез модулиране на транскрипционни фактори и други геномни и епигенетични увреди с последваща спиране на автофагията. Потискането на експресията на клетъчните връзки е ключов фактор в нарушаване на епителната бариера, което позволява придвижването на бактерии между епителните клетки. Допълнително интегритета на епителната бариера се уврежда от деградацията на екстрацелуларния матрикс от матриксните металопроотеинази. Продукти, секретирани от микроорганизмите, като късоверижни мастни киселини, могат да стимулират растежа на определени видове и да потиснат други. Свободни кислородни радикали и промени в рН на маточната микросреда също могат да задвижат патологичен процес. Активирането на инфламаторни вериги може да активира имунните клетки с последваща секреция на антимикробни пептиди, с намаляване на бактериалното количество. Затова определянето на здравия маточен микробиом, който създава състояние на еубиоза и се асоциира с благоприятен репродуктивен резултат, е отправна точка за диагностика и лечение на пациентки с репродуктивни неуспехи.

Двата основни метода за изследване на микробиома, културелен метод и геномно секвениране, имат своите предимства и недостатъци. Културелният метод е масово използван, евтин и достъпен, но не дава информация за всички налични микроорганизми в дадено местообитание. Счита се, че причини за това са микробиоми с ниска маса, а също и невъзможността за създаване на среда за култивиране на всички възможни микроорганизми. Към момента има данни, че само 1% от микроорганизмите могат да бъдат култивирани, в останалите 99% липсва растеж, което се дължи на строги изисквания за растеж – оптимална комбинация от нутриенти, кислородни концентрации, температурни условия, нужда от ко-култивация с други бактериални видове (Cicinelli et al., 2009), (Cicinelli et al., 2015). Голямо предимство на културелните методи е информацията за жизнеспособността на изолираните микроби и тяхната антибиотична резистентност. Геномното секвениране дава точни резултати за наличните микроорганизми въз основа на детекция на тяхната ДНК. Позволява резолюция по таксони, анализ на микробиома без

културелно изследване, количествено представяне на микробиома, кратко време на изпълнение, липса на необходимост от работа в аеробни и анаеробни условия, липса на голямо натоварване. Недостатъци на метода са неговата висока цена и липсата на информация за жизнеспособността на микробите, за тяхната биологична активност и антибиотична резистентност. Въпреки тези недостатъци ние избрахме и използвахме RT-PCR метода, за да получим сравними и достоверни резултати.



Фигура 18. Сравнение между двата основни метода на изследване на микробиома.

В изработването на оптимизиран протокол за изследване на ендометриалния микробиом проучихме различните начини за достигане на маточната кухина. Избрахме трансцервикалния достъп, въпреки реално съществуващите рискове за контаминация на пробата от вагинално и цервикално съдържимо, защото приемаме хипотезата на колектива на Chen (С. Chen et al., 2017) за съществуването на континуум на микробиота в женския репродуктивен тракт. При вземането на това решение имахме предвид и сме отчели риска от данните на колектива на Moreno (Moreno et al., 2016) за наличие на 20% разлика в състава на микробиота между долния и горния репродуктивен тракт. Избрахме трансцервикалния достъп до маточната кухина пред трансфундалния, поради разбираеми причини. Получаването на материал за изследване на ендометриалния микробиом е инвазивна процедура, която обаче не изисква предоперативна и преданестезиологична подготовка, с рискове за пациентката, които не надвишават средната честота на усложнения за вътрематочни манипулации. Не е повишен риска от хеморагия, болка, асцендиране на инфекциозни причинители, руптура и перфорация на матката.

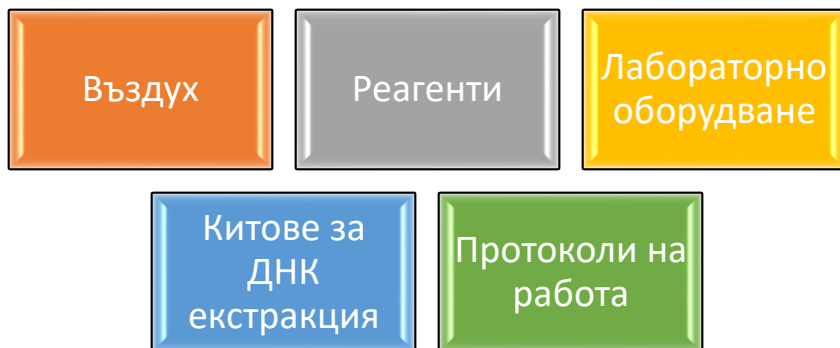
При избора на техника на пробовземане имахме предвид и способността на бактериите за инвазия на лигавиците. Някои бактерии адхезират само по повърхността на ендометриалния епител, докато други колонизират дълбоките слоеве на ендометриума. Поради този факт избрахме техниката на ендометриална биопсия пред аспирация, за да има възможност за получаване на материал за изследване и от дълбоките слоеве на ендометриума.

По отношение на фазата от менструалния цикъл след анализ на научната литература приехме средна лутеална фаза за пробовземане. Това е периодът, в който се развива ендометриална рецептивност и има най-голяма стабилност на маточната екосистема с доминиране на лактобацилите.

При изработването на протокола унифицирахме и селекцията и подготовката на пациентките за изследване. Подробната информация е описана глава „Материали и методи“. Унифицирахме и хирургичния метод и използвания инструментариум. Био-информативният анализ също бе идентичен във всички проучени случаи.

Микробиомът има своя физическа структура. Изследванията показват, че микроорганизмите образуват свой триизмерен биофилм с външен и вътрешен слой. Това добавя комплексност, която е малко изследвана към момента. Съществуването на този биофилм от влагалището до маточните тръби позволява сложни и динамични взаимоотношения между гаметите и ембриона и майчините тъканни повърхности (Swidsinski et al., 2013).

Микробиомите с ниска биомаса (ендометриален, кръв, урина) могат да играят важна роля в микробната хомеостаза и физиология, но тяхното изследване е често затруднено от потенциална контаминация, идваща от бактерии или бактериална ДНК, налична във въздуха, лабораторно оборудване и реагенти, които са неволно включени при събирането на пробите, обработката и анализа им. Един от най-значимите източници на бактериална ДНК контаминация идва от китовете за ДНК екстракция и лабораторни реагенти, дори и когато те са стерилни. Затова е от изключително значение изследователите, работещи с проби с ниска биомаса, да следват стриктни протоколи, за да избегнат заблуждаващи заключения относно секвенирания резултат. Тези мерки включват превенция на контаминацията преди секвенирането чрез максимално протективна екипировка, по време на секвенирането чрез включване на достатъчно негативни и празни контроли, а след секвенирането чрез развитие на биоинформационни канали за проследяване и изваждане на потенциални замърсители от истинския микробиом, наличен в пробата (Weiss et al., 2014).



Фигура 19. Потенциални източници за компрометиране на резултатите от геномното секвениране.

В нашето изследване сме се опитали максимално да ограничим факторите, влияещи на получаването и интерпретацията на резултатите. Проучихме и подбрахме методи за изследване и последващ анализ. Изградихме протокол за подбор на пациентки, тяхната подготовка, техника на получаване на материал от маточната кухина, обработка и анализ на резултатите. Според нашите проучвания проблема не е дискутиран и изследван в голяма хомогенна група сред българската популация.

В резултат на тези проучвания, подбор на методи и анализ, считаме, че получените от нас резултати са с високо ниво на точност и достоверност и дават възможност за създаването на логични изводи с научно и практическо приложение.

Смятаме, че предложението от нас протокол е стандартизиран и възпроизводим с високо ниво на точност и достоверност и с голяма възможност за приложение в клиничната и изследователска работа. В изграждането му сме взели предвид всички повлияващи фактори и сме разработили методология, целяща тяхното минимизиране и получаване на неподвеждащ бактериален състав. В резултат получените резултати могат да служат за основа на клинично поведение и разширяване и надграждане на изследванията в бъдеще. Дават възможност за създаване на логични изводи с практическо и научно приложение и разширяване на познанията ни в тази все още неизвестна и широка сфера.

При анализ на микробиома винаги трябва да се има предвид неговата динамика във времето, тъй като може да не съответства на актуалния микробиом към времето на ембриотрансфер и имплантацията. Поради този факт

резултатите от неговото изследване не трябва да се приемат за абсолютни и ограничаващи репродуктивните намерения.

V. Заключение – основни изводи

V.1. Заключение

Повтарящите се репродуктивни неуспехи се характеризират с дисбиотичен микробиот на женския репродуктивен тракт, особено в матката. Според наличните данни от литературата при 74% от жените с репродуктивни неуспехи има изолирани един или повече видове бактерии. Тези данни определено отварят дискусията за изследване на ендометриума преди ембриотрансфер. Към това трябва да се прибави и факта, че при 20 % от случаите има разминаване между микробиомния състав на влагалище и цервикс с този в ендометриум. 46% от IVF пациентките при наличие на рецептивен ендометриум имат не-лактобацилус – доминиран ендометриум и този микробиомен профил се асоциира с лош репродуктивен резултат по отношение на имплантация, бременност и живораждане.

Нормалната ендометриална микробна среда е ключова за репродуктивния успех. Нейната увреда може да активира неправилен имунен отговор във времето на имплантация и плацентация. Разширяването на изследванията и повишаване на разбиранията за влиянието на микробиота ще дадат възможност за оценка на риска за бъдеща бременност въз основа на бактериалния профил, възможност за модулиране на микробиомния състав и повишаване на репродуктивните резултати при двойки с RIF и RPL.

Ние установяваме разнообразие във видовете патогенни микроорганизми в ендометриума. Най-вероятно това е свързано с липсата на доминиращ вид микроорганизъм (каквото е актуалното схващане за здрав микробиом – повече от 90% относително наличие на лактобацили според наличните научни данни). Това може да доведе до колонизация от други бактериални видове с увеличаване на разнообразието на средата, настъпване на дисбиоза и асоциация с инфертилитет.

В бъдеще изследванията ще трябва да се фокусират върху дефиниране и по-ясно разбиране на здравия микробиом, а не само просто доказване наличието или липсата на лактобацили. Необходимо е изучаване на механизмите, които направляват взаимодействието между микробиота и организма-гостопримник.

V.2. Изводи

Като следвахме целта на настоящия труд и изпълнихме всички поставени изследователски задачи, може да се направят следните изводи:

1. Маточната кухина не е стерилна среда.

2. При пациентки с повтарящи се репродуктивни неуспехи има висок процент на липсващи лактобацили. Това се установява в повече от половината изследвани случаи. Не се намира разлика между двете изследвани групи (RIF и RPL), което е в подкрепа на основния патогенетичен механизъм на увреда на ендометриалния микробиомен профил.

3. Повтарящите се репродуктивни неуспехи се асоциират с ендометриална дисбиоза в половината от изследваните случаи.

4. При подробен анализ на видовете микробиом се намира изразена връзка на повтарящите се репродуктивни неуспехи със силно нарушения микробиом.

5. Липсва статистически достоверна разлика в двете изследвани групи (RIF и RPL) по отношение на ендометриалната дисбиоза, в подкрепа на общия патогенетичен механизъм на дисрупция на начална бременност.

6. При подробен анализ и сравнение на патогенните микроби в двете изследвани групи (RIF и RPL), в групата на RIF статистически достоверни са облигатно анаеробните *Megasphaera spp.*, *Veilonella spp.*, *Dialister spp.*, в RPL – групата статистически достоверни са факултативно анаеробните *Staphylococcus spp.*

7. При умерено нарушен микробиом статистическа достоверност има за факултативно анаеробните *Staphylococcus spp.*, *облигатно анаеробните Gardnerella spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyrromonas spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Mycoplasmas*, *Ureplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*.

8. При силно нарушен микробиом няма статистически достоверен резултат за конкретен патогенен микроб. Налице е тенденция близка до сигнификантната за повишена честота на факултативно анаеробните *Enterobacteriaceae*.

VI. Приноси

VI.1. Приноси с оригинален характер:

1. Направен е анализ на временния статус на ендометриума при голяма група пациентки с репродуктивни неуспехи без да се търси връзка с последващи епизоди на RIF и RPL.

2. Изследвана е честотата на дисбиотичния ендометриален микробиом в голяма група български пациентки с репродуктивни неуспехи.

3. Установяваме най-често асоциираните с репродуктивни неуспехи патогенни микроорганизми.

4. Разработваме методика за класификация на видовете ендометриален микробиом.

5. Утвърждаваме RT-PCR като надежден и прецизен метод в изследването на ендометриалния микробиом.

6. Въвеждаме изследването на ендометриалния микробиом като биомаркер за оценка на риска от RIF и RPL.

7. Разработваме протокол за изследване и последващо персонализирано етиологично лечение в случаите на патологични резултати, което дава допълнителна възможност за ограничаване употребата на антибиотици и развитие на антибиотична резистентност.

8. Разработеният протокол дава резултати с високо ниво на точност и достоверност, с възможност за създаването на логични изводи с научно и практическо приложение.

9. Въвеждаме метод в комплексната оценка на маточната кухина, в частност маточната лигавица, с възможност за широка употреба с цел подобряване на репродуктивния резултат при RIF и RPL.

10. Анализът ще бъде в полза за подобряване на семейното планиране и потенциално подобряване на дискусиата между пациент и лекуващ лекар по отношение на информираните очаквания и разглеждането на възможностите за лечение.

VI.2. Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърждаваме, че ендометриума не е стерилна среда.
2. Потвърждаваме, че при пациентки с репродуктивни неуспехи има висока честота на дисбиотична ендометриална среда.
3. Потвърждаваме надеждността на метода в комплекса от изследвания при пациентки с RIF и RPL.

VII. Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд

VII.1. Публикации, свързани с дисертационния труд:

Bodurska T., Konova E, Pachkova S, Yordanov A. *Endometrial microbiome and women's reproductive health-review of the problem endometrial microbiome and reproductive health*. Journal of pure and applied microbiology, 2021, 15(4):1727-1734; ISSN: 0973-7510; Web of Science, Scopus

Bodurska T., Konova E., Pachkova S., Yordanov A. *The role of uterine infection in pregnancy outcome: A case report*. Journal of biomedical and clinical research 2021; 14(2):178-181; ISSN:1313-6917; Web of Science (CABI)

Blazheva S., **Bodurska T.**, Ivanov P., Pachkova S., Konova E. *Endometrial immune cells and endometrial microbiome in women with recurrent implantation failure*. Bulgarian Journal of Clinical Immunology, 2022, 15(1): 3-12; ISSN:2738-7046

VII.2. Участия в научноизследователски проекти, свързани с дисертационния труд:

Проект 22/2022 г. Тема: „Проучване на ендометриалния имунен профил при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи“. Водещ изследовател: Доц. Д-р Емилияна Илиева Конова, „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“, Лаборатория по Клинична Имунология“ към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“.

VII.3. Участия в научни форуми в България:

Бодурска Т, Пачкова С, Йорданов А, Конова Е. „Клиничен случай на хроничен ендометрит и повтарящи се спонтанни аборти“ XX Юбилеен национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на българската асоциация на микробиолозите, Пловдив, 16.09-18.09.2022 г.;

Пачкова С, Блажева С, Иванов П, **Бодурска Т**, Конова Е. „Ендометриален микробиом при жени с репродуктивни проблеми“ XX Юбилеен национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на българската асоциация на микробиолозите, Пловдив, 16.09-18.09.2022 г.;

Блажева С, Пачкова С, Иванов П, **Бодурска Т**, Конова Е. Влияние на ендометриалния микробиом върху ендометриалните имунни клетки при жени с репродуктивни неуспехи. Годишна научна конференция по имунология, София, 16.12.2022 г.;

Бодурска Т, Блажева С, Пачкова С, Конова Е, Тотев Т. Изследване на ендометриален микробиом при пациентки с повтарящи се репродуктивни неуспехи. XXIV Конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве, 06-09.04.2023 г., Боровец;

Блажева С, **Бодурска Т**, Иванов П, Пачкова С, Конова Е. Проучване на ендометриалните имунни клетки при жени с нарушен ендометриален микробиом и репродуктивни неуспехи. XXIV Конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве, 06-09.04.2023 г., Боровец;

S. Blazheva, **T. Bodurska**, S. Ivanova, P. Ivanov, E. Konova. Research of the endometrial immune cells in women with reproductive failure and impaired endometrial microbiota. 4th International World of Microbiome Conference, 26-28.10.2023, Sofia.

VII.4. Участия в научни форуми в чужбина:

M. Atanasova, E. Konova, S. Blazheva, **T. Bodurska**. Serum levels of anti-elastin and anti-fibrillin 1 autoantibodies in recurrent pregnancy loss (RPL) patients. 16th Dresden Symposium on Autoantibodies, 12-15.09.2023, Dresden, Germany.

