МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

****

КРЕМЕНА СТОЙЧЕВА МЕСЕЧКОВА

Инфекциозна диагностика върху менструална тъкан при репродуктивни проблеми

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление

4.3.

Биологически науки

Докторска прорама: „Молекулярна биология”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Акад. Проф. Д-р Ваньо Митев, дм, дбн

Проф. Албена Тодорова, дбн

София, 2023

Дисертационнят труд съдържа 124 страници, 32 фигури и 16 таблици.
Цитирани са 267 литературни източника.
Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита
от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,
Медицински Университет – София.
Включените в дисертацията изследвания са извършени в:
Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,
Медицински Университет – София;
Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, София
Работата по дисертационния труд е финансирана частично
от Съвета за медицинска наука
на Медицински Университет – София
(Договор №209С/ 2018).

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

AMH - Anti-Müllerian hormone
BSA - Bovine serum albumin
CMV - Cytomegalovirus
CVS - Congenital varicella syndrome
DMSO -Dimethyl sulfoxide
EBV - Epstein-Barr virus
ESC - Endometrial stromal cells
FHA - Functional hypothalamic amenorrhea
FSH - Follicle-stimulating hormone
GBD - Global Burden of Disease
HHV - Human Herpes viruses
HHV-6 - Human herpesvirus 6
HHV-7 - Human herpesvirus 7
HHV-8 - Human herpesvirus 8
HIV - Human immunodeficiency virus
HMP - Human Microbiome Project
HSV - Herpes simplex virus
HSV1 - Herpes simplex virus type 1
HSV2 - Herpes simplex virus type 2
IVF - In vitro fertilisation
LH - Luteinizing hormone
NK - Natural killer cells
PCOS - Polycystic ovary syndrome
PCR - Polymerase chain reaction
PID - Pelvic inflammatory disease
PRL -Prolactin
TRIS - Hydroxymethylaminomethane
VZV - Varicella-zoster virus

ВПО - Външни полови органи
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕДТА - Етилен диамин тетраацетат
СЗО - Световна здравна организация
ЧПВ - Човешки папилома вирус

СЪДЪРЖАНИЕ:

РЕЗЮМЕ……...1
SUMMARY……....4
ВЪВЕДЕНИЕ……6
1.ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР……..8
1.1 Безплодие……8
1.1.1 Причини за безплодие при жената……...9
1.1.2. Ендокринно безплодие……..…10
1.1.3. Генетичен фактор за женско безплодие……11
1.1.4. Маточни и ВПО патологии и аномалии асоциирани с безплодие……...12
1.1.5. Инфекциозен фактор за женско безплодие……13
1.1.6. Други……..14
1.2. Инфекциозна етиология на женско безплодие……..…….15
1.2.1. Ендометриален микробиом- влияние върху човешката концепция……..……15
1.2.1.1. Ендометриална дисбиоза и имунологична реактивност……....16
1.2.1.2. Ендометриална дисбиоза и цервико-вагинална трансмисия на патогени…...…17
1.2.2. Бактериални патогени, замесени в етиологията на женско безплодие……..….17
1.2.2.1. Роля на *Chlamydia trachomatis,* като етиологичн фактор за женско безплодие……17
1.2.2.2. *Neisseria gonorrhoeae* и женско безплодие…….….22
1.2.2.3. Роля на условно-патогенни генитални микоплазми (*Mycoplasma hominis/genitalium/Ureaplasma urealyticum/parvum),* като етиологичен фактор за женско безплодие……..…...22
1.2.2.4. Роля на *Mycoplasma genitalium* за женско безплодие……..26
1.2.2.5. Роля на *Gardnerella vaginalis* за женско безплодие……28
1.2.3. Вирусни фактори замесени в етиологията на безплодие……...31
1.2.3.1. Роля на сем. *Herpesviridae* за безплодие……...…31
1.2.3.2. Роля на Човешки херпес вирус *HSV* за женско безплодие……..31
1.2.3.3. Роля на Човешкият цитомегаловирус (*CMV*) за женско безплодие…….....33
1.2.3.4. Роля на Човешкият Епщайн-Бар вирус (*EBV*) за женско безплодие……..….37
1.2.3.5. Роля на Човешкият херпесен вирус 6 (*HHV-6*) за женско безплодие……..……39
1.2.3.6. Роля на Човешкия херпесен вирус 7 (*HHV-7)* за женско безплодие……..…...40
1.2.3.7. Роля на Човешкия Варицела-зостер вирус (*VZV*) за женско безплодие……..….41
1.2.3.8. Роля на Човешкия херпесен вирус 8 (*HHV-8)* за женско безплодие……..…...42
1.2.3.9. Допълнителни данни за сем. *Herperviridae* и връзката им с репродукцията...…43
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ……..45
2.1. ЦЕЛ……45
2.2. ЗАДАЧИ……45
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ……...47

3.1. МАТЕРИАЛИ……..47
3.1.1. Биологичен материал……..47
3.2. МЕТОДИ…….……..48
3.2.1. Снемане на подробна анамнеза за репродуктивна несполука при изследваните групи инфертилни български жени…….……...48
3.2.2. Колектиране и преданалитична обработка на биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия…….……49
3.2.3. Изолиране на тотална ДНК от предобработена менструална тъкан/ ендометриална биопсия……50
3.2.4. Полимеразна верижна реакция (PCR - Polymerase Chain Reaction)…..…….52
3.2.5. Real time PCR - метод за количествен анализ……..……54
3.2.6. Дизайн на праймери за PCR амплификация на контролен CD housekeeping ген за човешка геномна ДНК……..…….57
3.2.7. Дизайн на праймери за PCR амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis*…….58
3.2.8. PCR амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген ……...……..59
3.2.9. Детекция на таргетни ампликони на Chlamydia trachomatis и CD housekeeping ген чрез електрофореза в агарозен гел……..……..60
3.2.10. Real time PCR амплификация на *Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*……...……...61
3.2.11. Real time PCR амплификация на ендометриален микробиом…..……..64
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ…….……...67
4.1. Подбор на клинични групи и изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването, съдържащи подробна медицинска информация, асоциирана с безплодие…….67
4.2. Оптимизиране на молекулярно-биологична методика за изолиране на тотална ДНК от биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия..……..70
4.3. Въвеждане на молекулярно-биологична методика за амплификация на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген…….……...71
4.4. Определяне обща честота на инфекция с таргетниия вирусно-бактериален панел в клиничните групи……..73
4.5. Определяне на клинико-патологичен статус и видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2,* EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8) в менструална тъкан от инфертилни жени /клинична инфертилна група/……..……..74
**4.6. Определяне на видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma*

***urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролната инфертилна група/……..…….89**
4.7. Определяне статус на ендометриален микробиом в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролна инфертилна група/…….……..91
4.8. Сравнителен анализ на данните от клинична и контролна инфертилна група относно приложението на таргетния вирусно-бактериален панел върху биологичен материал менструална тъкан и ендометриална биопсия……..……94
4.9. Обобщение и интерпретация на клиничните и молекулно-инфектологични резултати от настоящата разработка……….……99
4.10. Създаване на биобанка с изолирани матрици тотална ДНК от менструална тъкан и ендометриална биопсия на жени с репродуктивни несполуки от български произход…….……102
5. ИЗВОДИ…….106
6. БИБЛИОГРАФИЯ……...108
7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД……...119
8. ПРИНОСИ…….120

РЕЗЮМЕ:

Безплодието засяга почти 10 % от световната популация в репродуктивна възраст, като 200 000 двойки в България страдат от диагнозата, което я превръща в национален медико-социален проблем. Невъзможността на двойката да създаде поколение се класифицира от Световната здравна организация (СЗО), като петото най-значимо сериозно глобално увреждане с отрицателно въздействие върху самочувствието и живота на потърпевшите.

Настоящият дисертационен труд се фокусира върху инфекциозната етиология на женско безплодие в горен генитален тракт. Целта беше разработване на нов подход за неинвазивна диагностика на ендометриални инфекции върху проба- менструална тъкан. Менструалната тъкан съдържа части от функционалния слой на ендометриума (децидуа) и обхваща специфичния периметър на вирусна/бактериална активност и имплантация на бъдещия ембрион. Изборът на менструална тъкан, като целева биологична проба е оптимален вариант поради факта, че класическите биологични проби, информативни за състоянието на ендометриума (ендометриални биопсии) са инвазивни.

В дисертационното проучване бяха проведени молекулярно-инфектологични анализи за бактериално-вирусен панел (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) върху 335 жени с български произход. Изследваните жени бяха разпределени в три клинични групи спрямо вида биологичен материал и анамнеза за репродуктивна несполука: клинична инфертилна група /180 жени с биологична проба менструална тъкан и разнообразна анамнеза; контролна инфертилна група /65 жени с биологична проба ендометриална биопсия и анамнеза за спонтанни аборти/; здрава контролна група /90 фертилни жени с биологична проба менструална тъкан/.

Инфертилната контролна група, представена от жени с ендометриални биопсични проби, служи да се извърши сравнителен анализ с клиничната инфертилната група, за да демонстрира възможността менструална тъкан да се използва като неинвазивна биологична проба, аналогична като рерпрезентативност на инвазивната ендометриална биопсия.

В инфертилната клинична група бяха детектирани позитивни инфекции в 61,1 % (48,8 % бактериални и 22,2% вирусни), което кореспондира с данните в клиничната контролна група: 64,53% (49,23% бактериални и 15,3% вирусни патогени). Изследваната здрава контролна група се оказа 100 % негативна по отношение на целевия диагностичен панел.

Бактериите *Gardnerella vaginalis* и *Ureaplasma parvum* бяха открити в 69,31% и 61,36% от всички позитивни менструални тъкани и 31,25% и 3,12% от всички бактериално инфектирани ендометриални биопсии. Активна инфекция с *Mycomplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* беще детектирана с еквивалентна честота 2,27 % в позитивните за бактериални патогени менструални тъкани.

Активна инфекция с *EBV, CMV, HHV-6, HHV-7* беше открита в 30%, 30%, 20% и 20% от позитивните за вирусни фактори ендометриални биопсии и в 40%, 7,5%, 10% и 42 ,5% от менструалните тъкани.

Следните таргетни патогени не бяха открити в нито една от менструалните тъкани на изследваните пробанди: *Chlamydia trachomatis, Mycomplasma genitalium, HSV1, VZV* и *HHV-8*. В ендометриалните биопсии не бяха детектирани: *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycomplasma hominis/genitalium, HSV1/2, VZV* и *HHV-8*.

Освен за прицелния бактериално-вирусен панел, ендометриалните биопсии бяха тествани също за анаеробни и аеробни бактериални микроорганизми, част от които опортюнистични, както и коменсална фракция с цел проверка на ендометриалния баланс. Състояние на анаеробна и аеробна дисбактериоза беше открито при 53,33% и 27% във всички бактериално инфектирани ендометриални проби. Подобно изследване липсва върху пробандите с менструална тъкан, поради невъзможност от прилагане на използвания метод върху този тип проба.

Наблюдаваните сходни проценти на положителни за инфекции пациенти в инфертилната група (61,1%), изследвани с проба менструална тъкан и (64,53) в контролната инфертилна група, изследвани с проба ендометриална биопсия, демонстрират репрезентативността на неинвазивната менструалната тъкан като представителна проба за горен женски генитален тракт и потвърждават възможността същата да бъде използвана вместо инвазивна ендометриална биопсия. В двете групи наблюдавахме абсолютно съвпадение в процента на пациенти с положителен инфекциозен статус и разпределението им според бактериална или вирусна етиология. На ниво видово-специфична извадка, менструалната тъкан и ендометриалната биопсия показаха известни разлики в детектираните проценти патогени, което намира логично обяснение в разнородност на извадката и анамнезата на пробандите.

Докладваният отрицателен инфекциозен статус при 100% от изследваните здрави контроли, ясно сочи за негативно влияние на таргетния инфекциозен панел върху безплодието при жени.

Допълнително доказателство за репрезентативността на менструалната тъкан е фактът, че при успоредно тестване на пациентска извадка (15% от контролната инфертилна група) с двата типа проби, ендометриална биопсия и менструална тъкан, имаме 100% съпоставимост на резултатите.

Фокусът на настоящата разработка, а именно разработване на нов подход за неинвазивна диагностика на инфекции в горен женски генитален тракт чрез анализ на менструална тъкан, способства за улесняване на диагностичната практика и изясняване на инфекциозната етиология за репродуктивна несполука. Това е от съществено значение за прилагане на нов скринингов диагностичен алгоритъм при жени с репродуктивни несполуки и провеждане на индивидуализирана терапия. Реализираната естествена концепция след проведена терапия в 97% от случаите с ендометриална дисбиоза и положителен инфекциозен статус по отношение на таргетния обхват, представлява

категорично доказателство за ползата от приложението на въведения алгоритъм за диагностика и мониторинг.

SUMMARY

Infertility affects almost 10% of the world's population of reproductive age, as 200,000 couples in Bulgaria are suffering from the diagnosis, which means it is a national medico- social problem. The inability of a couple to create a child is classified by the World Health Organization (WHO) as the fifth most significant serious global disability with a negative impact on the self-esteem and quality of life of the probands.

The current dissertation focuses on the infectious etiology of female infertility in the upper genital tract. The aim was to develop a new approach for non-invasive diagnosis of endometrial infections on a sample: menstrual tissue. Menstrual tissue contains parts of the functional layer of the endometrium (decidua) and covers the specific perimeter of viral/bacterial activity and implantation of the future embryo. The choice of menstrual tissue as a target biological sample is an optimal and appropriate variant because the classic biological samples representative of the state of the endometrium (endometrial biopsies) is invasive.

In the current scientific work, molecular-infectological investigations for a bacterial-viral panel (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV -8*) were performed on 335 women of Bulgarian origin. The studied women were divided into three clinical groups according to the type of biological material and history of reproductive failure: clinical infertile group / 180 women with menstrual tissue and a diverse history; control infertile group /65 women with endometrial biopsy and history of miscarriages/; healthy control group /90 fertile women with menstrual tissue/.

The infertile control group /endometrial biopsy/ serves to be performed comparative analysis with the clinical infertile group with purpose to demonstrate the possibility of using menstrual tissue as a non-invasive biological sample with analogous representativeness of invasive endometrial biopsy.

Positive infections were detected in 61.1% (48.8% bacterial and 22.2% viral) in the infertile clinical group, which corresponds to our data in the clinical control group: 64.53% with positive infection status (49.23% bacterial and 15.3% viral pathogens). The studied healthy control group was 100% negative for the target diagnostic panel. *Gardnerella vaginalis* and *Ureaplasma parvum* were detected in 69,31% and 61,36% of all positive menstrual tissues and 31,25% and 3,12% of all bacterial infected endometrial biopsies. Active infection with *Mycomplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* was found in an equal rate of 2,27 % of all bacterial infected menstrual tissues.

Active infections of *EBV, CMV, HHV6* and *HHV7* were detected in 30%, 30%, 20% and 20% of the positive for viral factors endometrial biopsies and in 40%, 7,5%, 10% and 42,5% in menstrual tissue samples.

The next target pathogens were not detected in the menstrual tissue of studied probands: *Chlamydia trachomatis, Mycomplasma genitalium, HSV1, VZV, HHV8*. *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycomplasma hominis/genitalium, HSV1/2, VZV, HHV8* were not detected in the endometrial biopsies

In addition to the target bacterial-viral panel, endometrial biopsies were studied also for anaerobic and aerobic bacterial microorganisms, (some of which are opportunistic), as well as a commensal fraction in order to verify the endometrial balance.

Anaerobic and aerobic dysbiosis was detected in 53,33% and 27% of the bacterial infected endometrial samples. A similar study was not available on the probands, investigated with menstrual tissue due to the impossibility of applying the method used on this type of sample.

The observed similar rates of infection-positive patients in the infertile group (61.1%) examined by menstrual tissue and (64.53) in the infertile control group examined by endometrial biopsy demonstrate the representativeness of non-invasive menstrual tissue as a representative sample for the upper female genital tract and confirm the option to be used instead of an invasive endometrial biopsy. In both groups was observed an absolute correspondence regard to percentage of patients with a positive infectious status and the distribution of bacterial or viral etiology.

Menstrual tissue and endometrial biopsy showed some differences regarding the type-specific pathogens detected which finds a logical explanation in the heterogeneity of the sample collection and the anamnesis of the probands. The reported negative infection status in 100% of the examined healthy controls clearly indicates a negative impact of the targeted infectious panel on female infertility.

Additional proof of the menstrual tissue's representativeness is given by the parallel testing of 15% of the infertile control group with both types of samples /endometrial biopsy and menstrual tissue/ and the observed 100% comparability of results.

Our focus of research on a new approach for noninvasive diagnostics of infections in the upper female genital tract by analysis of menstrual tissue contributes to the diagnostic practice and clarifies the infectious etiology of reproductive failure. It is of a great importance for applying of a new screening diagnostic model for women with reproductive problems and for adequate and individualized therapy.

The realized natural conception after applied therapy in 97% of cases with endometrial dysbiosis and positive infectious status in regard to the target panel represents definitive evidence about the benefits of application of introduced algorithm for diagnostics and monitoring.

ВЪВЕДЕНИЕ:

Безплодието засяга милиони хора в репродуктивна възраст по света, като между 48 милиона двойки и 186 милиона индивида живеят с проблема в световен мащаб по СЗО. Приема се, че отрицателните странични ефекти са с по-висока социална тежест за жените, отколкото за мъжете. Счита се, че при 37% от безплодните двойки причината е в женския партньор. Въпреки низходящата тенденция на разпространение на първичен и вторичен стерилитет в икономически развитите страни и възходяща в други, този глобален здравен проблем е съизмерим с някои от широкозастъпените онкологични заболявания. Тежкото негативно физическо и психическо въздействие, което оказва върху двойката, индивида и обществата определя безплодието, като съвременен бич за човечеството и сериозно предизвикателство за медицинската и научна общност, работеща върху репродуктивните проблеми.

Най-честите и преобладаващи причини за стерилитет у жените включват ендокринни дисфункции, генетични и патоатоанатомични аномалии, физиологични увреждания, психогенни нарушения, инфекциозни процеси и др. Изясняването на точните причини за безплодие у жената е сложен и трудоемък процес, тъй като в повечето случаи причината е комплексна и обединява едновременно няколко фактора, формиращи комплицирана за диагностика и лечение симптоматична картина.

Инфекциозно обусловеният стерилитет при жената се изразява в нарушения на цервикалната пенетративност, тубарната функция и ендометриалната рецептивност, рефлектиращи в проблеми с концепция, усложнения, спонтанни аборти и др.

Проучването върху ролята на бактериални *(Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis)* и вирусни *(HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6/HHV-7, HHV-8)* патогени, като възможна причина за репродуктивна несполука при жени, е ключово за изясняване инфекциозната етиология на безплодие. Ендометриалната инфекция с таргетните за проучването патогени крие риск от проблеми с концепцията, имунологично отхвърляне, рекурентни ранни и късни аборти, неонатална инфекция, усложнения на бременността, фетални увреждания и раждане на дете с малформации.

Всичко изложено сочи нуждата от обстойна инфекциозна диагностика преди/или при настъпване на концепция. Честата безсимптомна персистенция на някои таргетни патогени и изолираната им локализация в горен генитален тракт докладва за необходимостта от въвеждане на скринингов алгоритъм за диагностика на ендометриални инфекции, като за целта е критично изследването да бъде провеждано върху неинвазивна проба.

Фокусът на разработката е върху ролята на прицелния бактериално-вирусен панел за женско безплодие в горен генитален тракт, чрез анализ на неинвазивна биологична проба-менструална тъкан.

Използването на биологична проба- менструална тъкан, покриваща функционалния ендометриум, директната бактериална/вирусна активност, както и имплантационния периметър на бъдещия ембрион, би спомогнало да се установи оптимален неинвазивен модел за диагностика на ендометриални инфекции. По този начин се покрива щадящо горен женски генитален тракт, където ~ 30% от инфекциите остават недиагностицирани чрез рутинната цервико-вагинална диагностика и респективно нелекувани.

Диагностиката на ендометриалното възпаление е от голяма полза за избор на адекватно лечение на идиопатично безплодие. Този подход безспорно увеличава шансовете за успешно зачеване, поддържане на жизнеспособна бременност и осъществяване на мечтата за дете.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

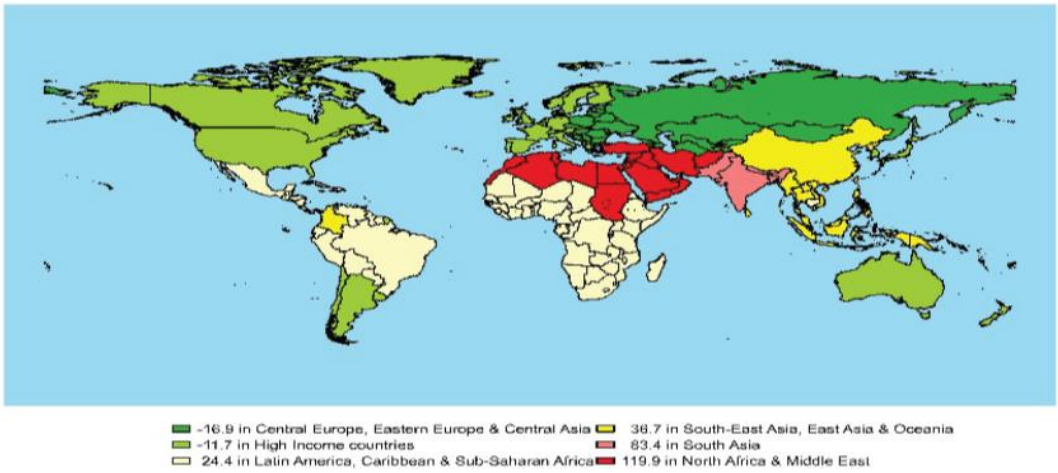
1.1. Безплодие

Според съвременните представи под понятието безплодие се разбира невъзможност на двойката да създаде поколение. С терминът безплодие или стерилитет се означава невъзможност за забременяване при интензивни опити без предпазни средства в продължение на 12 месеца при жени до 35 години и до 6 месеца при жени над 35 годишна възраст [1]. Най-общо стерилитетът може да бъде подразделен на първичен и вторичен. За първичен стерилитет се говори при невъзможност за забременяване при липса на предходна бременност, а за вторичен при невъзможност за зачеване, но при история на предходно раждане, аборт или извънматочна бременност.

Безплодието засяга милиони хора в репродуктивна възраст по света, оказвайки влияние върху техните семейства и общества. Класирано е като петото най-значимо сериозно глобално увреждане с отрицателно въздействие върху самочувствието на потърпевшите от Световната здравна организация (СЗО). Счита се, че отрицателните странични ефекти остават с по-висока социална тежест за жени, отколкото за мъже [2]. По данни на СЗО между 48 милиона двойки и 186 милиона индивида живеят с проблема на безплодие в световен мащаб, т.е. засяга около 10 % от световната популация [3-5].

В голямо мултинационално проучване на СЗО за определяне разпределението по пол и етиология на безплодието се изнесоха впечатляващи данни. Счита се, че при 37% от безплодните двойки причината е в женския стерилитет. При 35% от двойките с репродуктивни несполуки са идентифицирани проблемни причини и при мъжете и при жените. При 8% от случаите има наличие само на мъжки фактор на безплодие [6].

В едно от най-обстойните изследвания върху проблема се проследява честотата на разпространение на първичен и вторичен стерилитет в проценти на 100 000 човека във всяка страна през последните десетилетия. Обхванати са 195 държави в периода 1993-2017г., групирани в седем епидемиологични подрегиона, определени от Global Burden of Disease (GBD) база данни [7]. Общата тенденция на разпространение на безплодието показва низходяща траектория в икономически развити страни и възходяща тенденция в други. Тези констатации могат да намерят обяснение и в пропуснати случаи на безплодие поради ниска тенденция за възпроизводство и наличието на повече заведения за лечение на безплодие в тези региони (Фиг.1.).



[Borumandnia et al. 2021]

Фиг.1. Световна карта базирана на промените в честотата на разпространение на вторичното безплодие при жени, изготвена върху 100 000 човека във всяка страна в периода (1993-2017).

В България от стерилитет страдат 200 000 двойки, което превръща безплодието във важен национален медико-биологичен и медико-социален проблем. Затова основна задача на кабинетите, центровете и специализираните звена за борба с безплодието е да съдействат активно за поставяне на навременна и максимално точна диагноза за състоянието на фертилната и половата функция на жената и мъжа в двойката. Разбира се след диагностицирането на причината за безплодие следва прилагането на обоснована и ефективна правилна терапия, което е от изключителна важност за решаване на проблема и осъществяването на мечтата за дете. Дългогодишният практически опит от всекидневната работа в звената за борба със стерилитет у нас, потвърждава схващането, че жената и мъжът от бездетната двойка трябва да се разглеждат, изследват и подлагат на лечение, като зависими една от друга величини [8]. Препоръчва се диагностиката и лечението на такива семейства да се извършва на едно и също място - специализирано звено по репродуктивно здраве, където има тясна насоченост по проблемите на безплодието и професионално подготвени кадри.

Безплодието в двойката може да бъде предизвикано от разнообразни нарушения от страна на двамата партньори с превес на женския фактор. Настоящата дисертация се фокусира върху женския фактор и ролята му в проблематиката на репродуктивните несполуки.

1.1.1 Причини за безплодие при жената.

Изясняването на точните причини за безплодие у жената е сложен и трудоемък процес, тъй като в повечето случаи причината е комплексна и обединява няколко фактора едновременно, формиращи комплицирана за диагностика и лечение симптоматична картина [8].

Най-честите и преобладаващи причини за стерилитет у жените са няколко и касаят различни дялове на женската полова система, както и не само физиологични аспекти на женското здраве [9-10].

1.1.2. Ендокринно безплодие.

Ендокринен стерилитет е сборно понятие, тъй като обхваща редица ендокринни промени с различна етиология, патогенеза и клинично протичане. Характеризира се с разновидни разстройства във функцията на ендокринната система, предизвикващи смущения в хипоталамо-хипофизарната ос и овулаторни нарушения.

Хипоталамо-хипофизарната дисфункция води до нарушения във функцията на яйчниците и е типична за случаи на първична аменорея, късен менарх, хипоменструален синдром, нередовна менструация, както и хипоплазия на половите органи. При обследване на такива пациенти се установява намалена продукция на рилийзинг хормоните и гонадотропините, като количеството на естрогените е силно понижено [8].

Вследствие на нарушения в координацията на хипоталамо-хипофизарно-яйчниковата система нерядко се засягат и увреждат в различна степен други жлези с вътрешна секреция: щитовидна жлеза, надбъбреци, задстомашна жлеза (панкреас).

Овулаторните нарушения съставляват ~ 25% от познатите причини за женски стерилитет. СЗО класифицира овулаторните нарушения в 4 основни класа: хипогонадотропна хипогонадна ановулация (хипоталамична аменорея); нормогонадотропна нормоестрогенна ановулация (синдром на поликистозни яйчници (PCOS)); хипергонадотропна хипоестрогенна ановулация или (преждевременна яйчникова недостатъчност) и хиперпролактинемична ановулация (аденом на хипофизата).

Хипоталамичната аменорея (FHA) е свързана с намаляване на хипоталамичната секреция на гонадотропин-рилизинг хормон, което води до анормален растеж на фоликулите, ановулация и ниски нива на естроген [11-13].

Най-често срещаният тип нормогонадотропна нормоестрогенна ановулация е именно *синдрома на поликистозните яйчници*. PCOS присъства в 80-85% от жените с ановулация и засяга 9% от всички жени в репродуктивна възраст [14]. PCOS се свързва с дисфункция в развитието на зрял фоликул, водеща до ановулация. При тази патология FSH и естрогените са в нормални нива, а LH може да бъде с нормални или завишени стойности. Повишените нива на анти-Мюлеровия хормон (AMH) обяснява корелацията между високия брой задържани фоликули и появата на поликистоза на яйчниците [15].

Хипергонадотропната хипоестрогенна ановулация е присъща за преждевременната яйчникова недостатъчност и резистентност на яйчниците, свързана с възрастта на жените. С напредване на възрастта при жените се наблюдава значително увеличение в броя на мейотичните недизюнкционни събития и съответните анеуплоидни и хромозомно абнормни овоцити и ембриони [16].

Пролактинемията е призната от СЗО, като водеща причина за женско безплодие. Пролактинът предизвиква потискане на хипоталамичната секреция на гонадотропин-рилизинг хормон, което води до нисък LH, ановулация, съответно олигоменорея или аменорея. Високите серумни стойности на пролактин (20-50 ng/ml) причиняват недостатъчно освобождаване на прогестерон от жълтото тяло, което неминуемо скъсява лутеалната фаза и води до безплодие. Още по-високи стойности на пролактин (50-100 ng/ml) причиняват аменорея и олигоменорея поради анормална реципрочна връзка по оста хипоталамус-хипофиза, яйчници. Концентрация над 100 ng/ml се свързва с очевиден хипогонадизъм и аменорея и най-често с аденом на хипофизата [17].

1.1.3. Генетичен фактор за женско безплодие.

Генетичната етиология на женското безплодие включва хромозомни аномалии, моногенни и полигенни мутации, както и епигенетични мутации, обуславящи разновидни нарушения в ЖПС и ембрионалното развитие. Геномната основа на безплодието е много комплицирана и непрекъснато се обогатява с нови данни. Определя се от много фактори, оказващи влияние върху развитие на гамети, физиология и функционалност на репродуктивните органи, развитието на ембриона и по-нататъшната му диференциация.

Честотата на хромозомните аномалии при жените е сравнително висока ~ 10% [18]. В тази категория попадат едни от най-често срещаните синдроми като Даун, Патау, Едуардс, Клайнфелтер, Търнър, както и редица микроделеционни синдроми. Яйцеклетките са склонни към генетични изменения поради стареене, което определя критичната роля на майчината възраст в патогенезата на хромозомните аномалии.

Напредналата възраст най-често се асоциира с анеуплоидия поради неправилно разделяне на хромозомите по време на мейозата и отслабена кохезионна адхезия, рефлектираща върху продукция на гамети с монозомия и полизомия по отношение на засегнатите хромозоми. Подобна аномалия в хромозомната сегрегация се счита за основна причина за стерилитет поради гонадна дисгенезия и яйчници, формирани от бяла фиброзна стромална тъкан без яйцеклетки или фоликуларни производни, спонтанен аборт и грешки в развитието на ембриона [19-24].

Синдромът на поликистозните яйчници (PCOS), асоцииращ се с ановулация, безплодие и високи нива на загуба на бременност има значителна наследствена компонента, като синдромът се развива в ~ 60-70% от дъщерите на жени, страдащи от него [25-27]. Чрез геномни асоциативни проучвания са идентифицирани някои кандидат-гени с адитивен ефект (*DENND1A, LHCGR, FSHR, ZNF217, YAP1, INSR, RAB5B, C9orf3*). Докладват се епигенетични мутации в 40 гена и разлика в метилирането им в сравнение със здрави индивиди, като *EPHX1, LMNA* и *GSK3A* се цитират с най-висока асоциация със синдрома на поликистозните яйчници [28-29].

Добре познатата преждевременна яйчникова недостатъчност, която се определя, като настъпване на преждевременна менопауза при жени под 40 години, също е продукт на

хромозомните аномалии, концентрирани в Х хромозомата, както и автозомите [30]. Множество генетични отклонения се асоциациират с развитие на преждевременна яйчникова недостатъчност преобладаващо в следните гени: *FMR1, BMP15, AR, CDKN1B, CYP19A1, GDF9, FIGLA, FOXL2, FOXO1a, FOXO3a, INHA, LHX8, NOBOX, NANOS3, FSHR* и *SALL4* [31].

Редица генетични моно, полигенни и епигенетични мутации оказват директно или индиректно влияние върху инфертилитета. Особено ценно в съвременната медицина е приложението на индивидуалното молекулно профилиране по отношение на генетичните флуктуации, обуславящи вродени или придобити патологии на репродуктивна несполука. Този подход спомага не само за изясняване на генетичната причина за заболяването и фамилна обремененост, но и предоставя важни данни за профилактика на медицинските рискове, свързани с генно-вариантната находка. Прилагането на терапевтични алгоритми спрямо персонализирания генетичен профил, целящи мониторинг и поддържащо /компенсаторно/ лечение на сложни състояния, като вродена тромбофилия, преeклампсия и др., са сред най-често практикуваните за предотвратяване на неблагоприятен изход от бременността, като късни усложнения, спешни животозастрашаващи състояния и/или загуба на бременност. Благодарение на прицелната генетична диагностика, описаният неблагоприятен сценарий все по-успешно се избягва в наши дни.

1.1.4. Маточни и ВПО патологии и аномалии асоциирани с безплодие.

Маточните фактори играят съществена роля, като резон за безплодие. Сред най-често регистрираните патологични състояния са: миоматоза, ендометриоза, полипи, синехии, хроничен ендометрит, малформации на маточното тяло (еднорога матка).

Счита се, че безплодието, дължащо се на вродени патологии на матката, представлява приблизително 8% от причините за безплодие при жените. Въпреки това, 25% от жените претърпяли спонтанни аборти в късен първи триместър или във втори триместър се установяват също с вродени маточни патологии [32].

Доказано е, че жените със субмукозни или субмукозно-интрамурални фиброми, деформиращи маточната кухина имат намален процент на забременяване [33]. С премахването на операбилните миоми бременността и раждаемостта се увеличават закономерно [34].

Асимптоматичните полипи също причиняват стерилитет, като различни проучвания докладват за повишена честота на успешни бременности 28-63% при прилагане на хистероскопска полипектомия за оперативното им отстраняване [35].

Според изследванията основна причина за стерилитет е развитието на ендометриоза. **Ендометриозата** се дефинира, като ектопична локализация на ендометриална тъкан извън маточната кухина. Патологията засяга ~ 10-15% от жените в репродуктивна възраст [36], като прогнозата е, че 40-50 % от жените с ендометриоза ще се сблъскат с безплодие [37].

Наличието на туморни формации в маточното тяло и яйчниците също предизвиква тубарно безплодие, тъй като се създават условия за механично притискане на фалопивите

тръби, функционални изменения и дори нарушения в анатомичния им строеж (наличие на яйчникови кисти).

Не на последно място е нужно да се спомене, като потенциална причина за безплодие травматичното увреждане на ендометриума в резултат на достигане до по-голяма дълбочина по време на процедурата при прекъсване на бременност („престъргване“) или ревизия на маточната кухина след раждане. Подобни травматични манипулации водят до частично или тотално унищожаване на базалния слой на маточната лигавица [8].

Аномалии, засягащи маточната шийка също се асоциират, като етиологични фактори за безплодие. Изразяват се в стеноза на цервикалния канал и/или увреждане на цервикалните жлези вследствие на оперативна намеса или електрокаутеризация, травматични изменения на цервикалния канал от тежко раждане или аборт, промени в характеристиките на цервикалния секрет и др. Травматичните увреждания на жлезите на цервикалния канал влияят негативно върху естествената концепция поради промени във физико-химичните качества на цервикалния секрет, възпрепятствайки пенетрацията на сперматозоидите.

Вродените и органични изменения на ВПО в частност влагалището често пъти затрудняват или правят напълно неосъществим половия акт. При налични дефекти възниква препятствие за депонирането на семенната течност, което води до инфертилитет.

1.1.5. Инфекциозен фактор за женско безплодие.

Инфекциозните процеси са преобладаващ фактор за безплодие (23%) и водеща причина за развитие на цервицити, адхезии на таза и маточните тръби, нарушения в ендометриалната рецептивност, спонтанни аборти и неонатална инфекция.

Основен фактор за генитално възпаление се явяват следните патогенни и условнопатогенни микроорганизми: *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Гениталната туберкулоза, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Gardnerella vaginalis, Herpes simplex virus type 1, Herpes simplex virus type 2, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Varicella-zoster virus, Human herpesvirus 6, Human herpesvirus 7, Human herpesvirus 8* и др.

Голямото разнообразие от етиологични фактори, предизвикващи инфекциозен стерилитет, обуславя сложна и пъстра клинична картина на заболяванията и затруднява ранната диагностика и лечение. Допълнително усложнение на проблема се привнася от устойчивост и резистентност на патологичните причинители към медикаментозно въздействие.

Инфекциозно обусловеният стерилитет се изразява в нарушения на цервикалната пенетративност, тубарната функция и ендометриалната рецептивност, рефлектиращи в проблеми с концепция и спонтанни аборти. Ендометриалната инфекция, крие риск и за неонатална инфекция, последвана от спонтанни аборти, усложнения на бременността и раждане на дете с малформации.

Цервикалната пенетративност, засегната от наличието на хроничен или остър ендоцервицит може да е пречка за преминаването на сперматозоидите. За този ефект имат роля повишеното количество на левкоцитите в цервикалния секрет, което предизвиква енергийни смущения в преминаващите сперматозоиди и нарушава праволинейното им постъпателно движение и цялостна подвижност.

Тубарните нарушения варират от пълно запушване на различни отдели на маточните тръби, през стеснения в отделни участъци и перитубарни сраствания, които оказват въздействие върху тубарната перисталтика и водят до развитие на хидросалпингит, тазово-възпалителна болест (PID) и др. [8,10]. Дисфункцията на фалопиевите тръби представлява абсолютна причина за безплодие тъй като възпрепятства придвижването на сперматозоидите до яйцеклетката и респективно на яйцеклетката в посока маточната кухина. Съществуват доказателства, че пациентите подложени на in vitro оплождане имат 50 % намалени шансове за концепция, ако са налице тубарни нарушения [38].

Ендометриалната рецептивност се повлиява от инфекциозните процеси в маточната кухина, като се създава враждебна среда за имплантация и развитие на ембрион [39]. Хроничният или остър ендометрит предизвикват инфертилитет при жената. Хроничните инфламаторни изменения на ендометриума водят до нарушени процеси на децидуализация, трофобластна инвазия, понижената рецептивност спрямо яйчниковите хормони, повишена тромбогенност, риск от фетална инфекция. Чрез подобни патофизиологични каскади ендометриума става негоден за нидация на яйцеклетката и успешно развитие на ембриона. Нерядко се наблюдава имунологично отхвърляне на ембриона вследствие на инфекциозна персистенция, изразяващо се в ранни спонтанни аборти. Дисбиотични състояния в ендометриалния микробиом е друг основен фактор, възпрепятстващ успешната имплантация.

Необходимо е да се спомене и вариант на тубарно безплодие, предизвикано от инфламаторни процеси в съседни органи, като например: остър или хроничен апендицит, апендикуларен абсцес, инфекциозни и възпалителни чревни заболявания.

Неонаталните инфекции са водеща причина за ранни и късни спонтанни аборти. За превенция на инфекциозно обусловени усложнения на бременността се препоръчва преконцепционален или пренатален скрининг на бременни за редица по-чести бактериални и вирусни инфекции.

1.1.6. Други.

В 16% от случаите на безплодие, причината остава неизяснена. Психогенното безплодие се счита за преобладаващо в тази група. Много автори показват съществуването на вътрешно неосъзнато отхвърляне на бременността, което се проявява с овулаторни смущения и вторична аменорея.

1.2. Инфекциозна етиология на женско безплодие.

1.2.1. Ендометриален микробиом- влияние върху човешката концепция.

Промените в микробиома на женския генитален тракт са тясно свързани с гинекологични и акушерски патологии, а наличието на дисбактериоза може да повлияе репродуктивния изход дори по време на лечение на стерилитет.

Човешкият микробиом за първи път е описан като „екологичната общност на коменсалите, симбиотични и условнопатогенни микроорганизми, които буквално споделят нашето телесно пространство" [40]. Проектът за човешкия микробиом (HMP) [41] инициира събирането на задълбочени знания за микробиома в различни части на тялото, но дефинирането на здравословен бактериален състав на матката и произходът му остава обект на дебат. Хипотезира се, че колонизацията на матката потенциално възниква от устната кухина, червата, кръвотока и не на последно по значение място чрез вагинална трансмисия към горен генитален тракт [42-43].

Независимо от произхода на ендометриалния микробиом, изследванията сочат, че е много разнообразен и рядко населен в сравнение с долните отдели на женския генитален тракт [44-46]. Редица проучвания оценят здравословното състояние на ендометриалния микробиом при жени в репродуктивна възраст, като повечето съобщават за доминиране на видовете от р. *Lactobacillus.* Лактобацилите играят важна роля в поддържането на вагиналния микробиом чрез синтез на бактериоцини, водороден пероксид и млечна киселина. В резултат се понижава киселинността (pH) на влагалището и възпрепятства намножаването на бактериални патогени.

На база обстойни наблюдения се приема теорията за два възможни типа бактериален състав в ендометриума: *Lactobacillus*- доминиращ с изобилие на *Lactobacillus spp*. > 90%) и Не-*Lactobacillus* доминиращ с изобилие на *Lactobacillus spp*. < 90%) [47-51].

При здрави пациенти, *Lactobacillus* е сочен за най-изобилния бактериален род в ендометриална тъкан, подобно на влагалището. Проведени са допълнителни анализи за установяването на бактериални взаимодействия в ендометриума и се установява, че *Lactobacillus* е отрицателно свързан с *Gardnerella, Bifidobacterium* и *Atopobium,* докато корелира положително с коменсалните фракции на *p. Clostridium* и *p. Streptomyces* [52].

Не-*Lactobacillus* доминиращ тип се установява обикновено, ако извадката включва нездрави доброволци, жени с наличие на патологии [44, 53-54].

В проби от ендометриална течност, често се докладват представители на *Acinetobacter, Corynebacterium, Cutibacterium, **Escherichia, Staphylococcus** и **Streptococcus, и др., които*** **биха могли да са част от физиологичното ядро на ендометриалния микробиом** [53-54]. Не е постигнат консенсус по отношение на микробиомното физиологично ядро вътре в маточната кухина поради многобройни ограничения, като големина на извадката в текущите изследвания, вариации в експерименталния дизайн и др.

Наблюдават се значителни колебания във фракциите на ендометриалния микробиом [55-56]. Комбинация от фактори, като напреднала възраст, брой аборти, вагинално раждане би могла да намали разликите между цервико-вагиналния и ендометриалния микробиом. Обикновено механизмът е чрез смущение/нарушение на бариерата между затворената маточна среда и цервико-вагинална зона. Вследствие се предполага, че промените в цервико-вагиналния микробиом при определени обстоятелства могат да повлияят пряко бактериалните фракции и корелациите помежду им в ендометриума [55]. Тази теория се потвърждава от публикувани данни, че по-голямата част от пациентите с НЕ- *Lactobacillus* доминиращ ендометриален микробиом са имали в миналото същия статус на вагинален микробиом, както и всички пациенти с НЕ- *Lactobacillus* доминиращ ендометриален статус са имали история на дисбиотични вагинални бактериални фракции [51].

По-доброто разбиране на ендометриалния микробиом при здрави жени и съответно как промените в състава му засягат плодовитостта би позволило персонализирано лечение на дисбалансирания микробиом по време на асистирани репродуктивни терапии, като в крайна сметка логично би довело до подобряване на клиничните резултати.

Различни вирулентни механизми обясняват как промените в интраутеринните коменсални бактериални фракции могат да предизвикат безплодие и неблагоприятни гинекологични състояния:

1.2.1.1. Ендометриална дисбиоза и имунологична реактивност.

Популацията на коменсалните микроорганизми (физиологичното ядро на ендометриума с преобладаваща фракция от лактобацили) играе съществена роля в поддържането на еубиотично състояние. Различни бактериални съобщества, съставящи ендометриалния микробиом са в състояние да се намножат и придобият вирулентни свойства чрез механизми като разграждане на муцин, формиране на биофилм с антимикробна резистентност, което води до състояние на дисбиоза [57]. Дисбалансът в бактериалните фракции от своя страна може да повлияе на вътрематочния метаболитен състав, обуславящ завишена имунологична реактивност [58]. Възпалителните реакции срещу бактериални промени в ендометриалния микробиом се свързват с инфертилитет и персистират в изява на гинекологични заболявания. Например повишената експресия на провъзпалителните фактори имуноглобулин *IgM, IgA* и *IgG* е характерна за пациенти с хроничен ендометрит и повтаряща се неуспешна имплантация [59]. Значително по-високи нива на провъзпалителните цитокини *IL-6, proIL-1* и *IL-1* се срещат сред пациенти с ендометриоза [60-61]. Анализи върху ендометриални биопсии и течности от 130 инфертилни пациентки показват понижено присъствие на р. *Lactobacillus* и по-високи количества *Anaerococcus, Bifidobacterium, Dialister, Gardnerella* и *Prevotella* в ендометриални проби от групата с диагноза хронична ендометриоза, спрямо контролната група [62].

1.2.1.2. Ендометриална дисбиоза и цервико-вагинална трансмисия на патогени.

В допълнение, ендометриалната дисбиоза благоприятства трансмисията на цервико-вагинално локализирани патогенни бактерии към ендометриалната дисбалансирана и нерегулирана микросреда. Редица проучвания демонстрират ролята на ендометриалната дисбиоза за трансмисия на цервикално локализирани бактериални и вирусни патогени чрез механизми на вертикална трансмисия и инфектиране на горен генитален тракт [63-67].

Инфектирането на маточната кухина с представители, нехарактерни за ендометриалния тракт би могло да бъде предизвикано и чрез приложението на технологии и процедури на асистираната репродукция, както и при поставяне на механични средства за контрацепция и терапия [68-69]. Друг много вероятен и многократно потвърден механизъм за маточна колонизация е чрез вертикална трансмисия посредством инфектирани с микроорганизми човешки сперматозоиди [70]. Преобладаващата микробна находка от необичайни заселници на ендометриум включва *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Gardnerella vaginalis, Herpes simplex virus type 1, Herpes simplex virus type 2, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Varicella-zoster virus, Human herpesvirus 6, Human herpesvirus 7, Human herpesvirus 8 ,* които са и обект на изследване в настоящия дисертационен труд [71-76].

1.2.2. Бактериални патогени, замесени в етиологията на женско безплодие.

Широкото разпространение на полово предаваните инфекции замесени в състоянието инфертилитет при жени, остава сериозен здравен проблем [77]. Особена важност представлява детектирането на микроорганизми, водещи до ендометриално възпаление при жени, тъй като ако остане нелекувано, крие риск от развитие на сериозни последствия: запушване на фалопиеви тръби, хронична тазово-възпалителна болест, проблеми с концепция; ектопична бременност, аборт, преждевременно раждане, неонатална инфекция, дори рак на яйчниците и др. [78-80]. Често картината на продължителни репродуктивни несполуки с неизяснена причина при жени се допълва от наличието на недетектирани своевременно микробиални патогени в ендометриума [81].

1.2.2.1. Роля на *Chlamydia trachomatis*, като етиологичн фактор за женско безплодие.

Chlamydia trachomatis представлява грам-отрицателна бактерия с уникален двуфазен цикъл на развитие. Бактериалните инфекции с *Chlamydia trachomatis* са сред най-широко разпространените полово предавани заболявания, като ~ 80% от гениталните инфекции при жени и 50% от случаите при мъже протичат асимптоматично [82].

Броят на инфекциите на гениталния тракт с *Chlamydia trachomatis* нараства в световен мащаб. Понастоящем липсва единен за всички страни скринингов подход за ограничение на разпространението на бактерията. Съвременното антибиотично лечение очевидно не успява да предотврати повишаването на честотата и, вероятно поради асимптоматичнос, като към момента няма и налична ваксина [83].

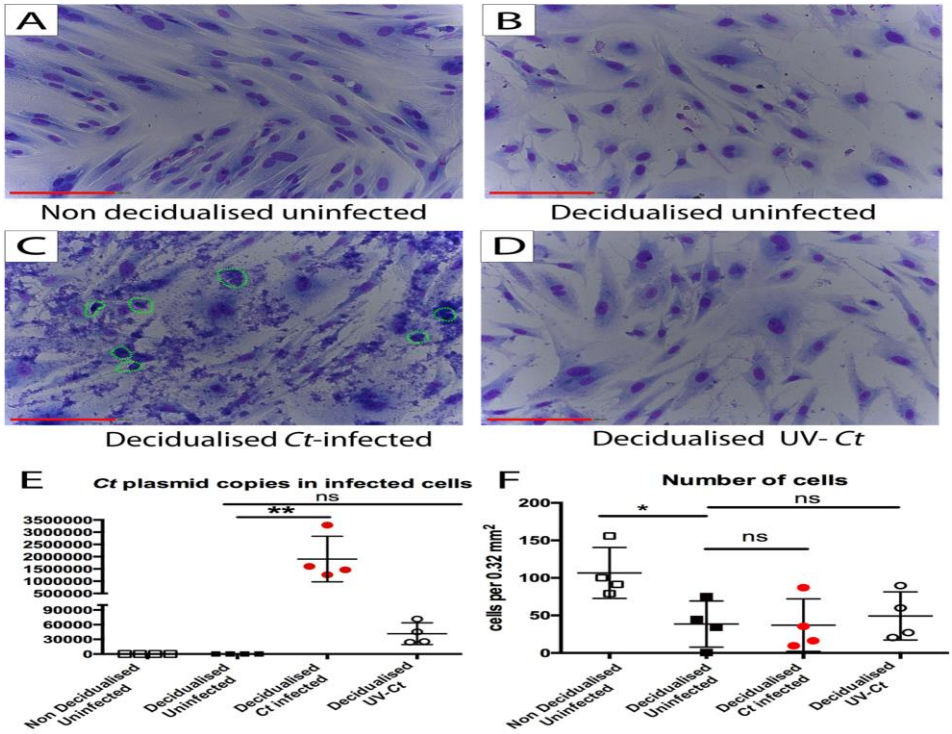
При жени първоначално възпалителният процес засяга лигавицата, покриваща канала на маточната шийка (ендоцервицит) и уретралния канал (уретрит). В тези локализации хламидийната инфекция би могла да персистира дълговременно. Недиагностицирана и нелекувана долна хламидиоза може да се разпространи към горните части на гениталния тракт – ендометриум и фалопиеви тръби. Трансмисията на една хламидийна инфекция към горен генитален тракт обикновено е в резултат на възходяща инфекция от инфектиран долен генитален тракт. Наблюдава се и вариант на директна вертикална трансмисия чрез инфектиран мъжки фактор (сперматозоидна компонента). *Chlamydia trachomatis* и вътреклетъчните патогени, действащи вътре в сперматозоида, попадат директно в маточната кухина и/или в новообразувалата се зигота, като правят развиващия се ембрион имуногенен. В резултат се инициират възпалителни ендометриални процеси и такива на имунологично отхвърляне в имплантационния сайт, в случай на реализирано оплождане.

Възпалителните ендометриални процеси се изразяват впоследствие предимно в стесняване на фалопиевите тръби, формиране на масивни сраствания, възпрепятстващи нормалното протичане на менструацията и възможността за концепция, развитие на тазово-възпалителна болест, ендометрит, салпингит, цистит, преждевременно раждане, неонатална инфекция [84]. Тези усложнения застрашават репродуктивните способности на жената, като се асоциират с вторичен инфертилитет.

Тазово-възпалителната болест е водеща причина за обратим стерилитет, като всеки нов епизод на болестта увеличава риска от развитие на безплодие. Микроорганизмът, който носи най-голям риск от инфертилитет във връзка с възпалителната тазова болест е *Chlamydia trachomatis*. Една на всеки 4 жени с тубарен стерилитет има наличие на положителни антитела срещу хламидия, които са обратно пропорционални на честотата на забременяване [85]. Броят на епизодите на възпалителна тазова болест и тежестта им играят роля за вероятността от безплодие. От целево проучване върху тази хипотеза бяха изнесени данни, че случаите на бременност след първи епизод на PID са 89%, след два епизода 77% и след три епизода намаляват едва на 46% [86]. По отношение на тежестта на възпалителната тазова болест, като лека, умерена и тежка клиника, нивата на живородени раждания са респективно 90%, 82% и 57% [87]. Последствията от тазово-възпалителна болест се асоциират също с ектопична бременност. Горната хламидиоза се докладва, като причина за над 2/3 от случаите на инфертилитет поради запушени фалопиеви тръби и 1/3 от ектопичните бременности [88].

Освен инфектирането на горен генитален тракт и последващите възпалителни усложнения, водещи до нарушена възможност за зачеване, други вирулентни механизми засягат процесите на децидуализация на ендометриалните клетки, пряко свързани с успешната имплантация и спонтанни аборти. Giakoumelou и екип проучват ролята на инфекцията с *Chlamydia trachomatis* върху децидуализацията на ендометриалните стромални клетки и секрецията на хемокини. В това изследване за първи път недвусмислено се доказва способността на *Chlamydia trachomatis* да инфектира и пролиферира в

ендометриални стромални клетки, предизвиквайки увреждане на децидуализацията (Фиг.2.) [71]. В "in vitro" модел, активната хламидийна инфекция причинява понижаване на mRNA експресионните и протеинови нива на широкоизползвания маркер за децидуализация *PRL*. *PRL* представлява ключов фактор не само в процеса на децидуализация, но и в епителната клетъчна диференциация, имплантация, ангиогенеза, трофобластен растеж, имунна регулация по време на ранна бременност [89]. Наблюдението е критично важно тъй като точно понижаването на *PRL* се свързва с повтарящи се аборти [90].



[Giakoumelou et al. 2017]

Фиг. 2. Инфекция с Chlamydia trachomatis (Ct) на децидуализирани ESC.

- ESC бяха заразени с Ct MOI 2 след изпълнение на протокол за "in vitro" децидуализация. Използвани са недецидуализирани неинфектирани ESC, неинфектирани децидуализирани ESC и третиран с UV-Ct ESC, като контроли. 48 часа след инфекцията се събира ДНК за qPCR и клетките се оцветяват с Giemsa. Клетъчното преброяване се провежда в 15 зрителни полета на ямка с размери 0.32 mm^2 всяко.

A). Недецидуализирани незаразени ESC са удължени и тънки.

B). Децидуализираният неинфектиран ECS е по-кръгъл и по-голям в сравнение с не децидуализиран ESC.

C). Ct заразен децидуализиран ESC показва признаци на инфекция и съдържа включвания, оцветени в лилаво чрез оцветяване на Giemsa (маркирани със зелени кръгове).

D). Децидуализирани ESC, третирани с UV-CT, не съдържат хламидиални включвания и приличат на неинфектиран децидуализиран ESC на външен вид.

E). 25 000–75 000 Ct плазмидни ДНК копия бяха открити в UV-Ct третиран ESC. Инфектираният с Ct ESC има значително по-висок брой от 1 200 000–3 200 000 плазмидни копия на проба, което показва пролиферация на Ct само в инфектирани клетки.

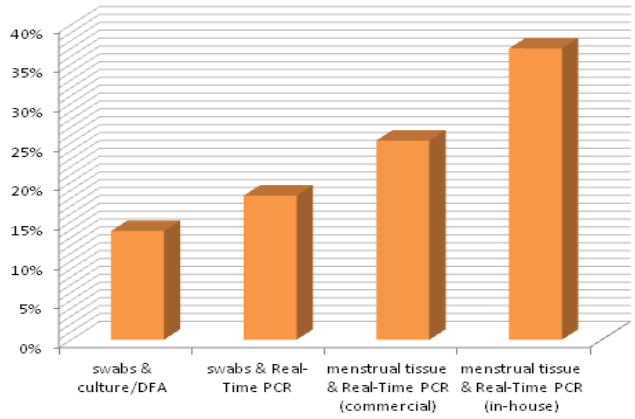
F). Клетъчното преброяване върху оцветен с Гимза ESC показва, че децидуализираните неинфектирани клетки са значително по-малко в сравнение с недецидуализираните контроли RM one-way ANOVA-Friedman's test with Dunn's multiple comparisons test, p = 0.0185, n = 4). Обратно, броят на третирани с UV-Ct клетки и инфектирани с Ct клетки е подобен на този на неинфектирани децидуализирани клетки ESC. Скалите са равни на 200 µm. Графиките показват средното и стандартното отклонение.

Вследствие на активната хламидийна инфекция се докладва и ефект на понижени нива на хемокини *CXCL12* и *CXCL16*. Наблюдението доказва директната връзка на активна инфекция с *Chlamydia trachomatis* със спонтанен аборт, защото точно тези цитокинови фактори провокират трофобластната миграция [91-97]. Именно хламидийната инфекция води до дефектна трофобластна инвазия поради липса на съществени сигнални молекули, секретирани от майчината децидуа (функционален слой на ендометриума), като *CXCL12* и *CXCL16*.

Инфектирането с *Chlamydia trachomatis* по време на бременност е свързано и с риск от преждевременно разкъсване на родилни мембрани, ниско тегло на новороденото и аборт [98]. Патогенът може да се предаде и от майката на бебето по време на раждането, причинявайки неонатална пневмония и конюнктивит [99-100].

В обобщение можем да кажем, че изследването на потенциални ендометриални инфекции за *Chlamydia trachomatis* е от изключителна важност за женското здраве, като цервикалния скрининг определено не е достатъчно информативен за да можем да изключим хламидийна инфекция. В подкрепа този факт прилагаме експериментални данни на една от водещите референтни лаборатории за молекулярна и имунологична диагностика на репродуктивни несполуки, Locus Medicus (Фиг.3.). Лабораторията е пионер в използването на биологичен материал менструална кръв, като неинвазивна проба за скрининг на инфекции в горен генитален тракт. Чрез стандартно микробиологично култивиране се детектират 13% позитивни резултати за Chlamydia trachomatis в цервико-вагинални биологични материали (тампони), докато с приложение на Real-time PCR метод се достигат 18%. При анализ за детекция на таргетната бактерия чрез комерсиален Real-time PCR кит, позитивните резултати за наличие на патогена върху проба менструална тъкан достигат 25%. Използвайки Real-time PCR „know how" методика за детекция на хламидийна инфекция върху менструална тъкан, екипа докладва 37%-45% позитивни резултати. Ясно личи, че най-висока диагностична ефективност по отношение на бактерията Chlamydia trachomatis, се постига при използването на съвременни молекулярно-биологични методи за количесвен Real-time qPCR върху проби от менструална тъкан на инфертилни жени. Разликите с алтернативните рутинни методи и проби са сигнификантни.

В заключение от литературни данни и персонален експериментален опит можем да заключим, че комбинираният диагностичен подход на анализ на цервико-вагинални биологични проби и менструална тъкан водят до 87% детекция на Chlamydia trachomatis , покривайки възможно най-обстойно долен и горен женски генитален тракт по неинвазивен начин.



[Locus Medicus]

Фиг. 3. Позитивни резултати за *Chlamydia trachomatis*, детектирана с различни биологични проби и диагностични методи при инфертилни жени.

- 13% позитивни резултати за *C. trachomatis* в цервико-вагинални биологични материали, изследвани чрез микробиологична култура;
- 18% позитивни резултати за *C. trachomatis* в цервико-вагинални биологични материали, изследвани чрез real-time PCR;
- 25% позитивни резултати за *C. trachomatis* в менструална кръв, изследвани чрез комерсиален real-time PCR кит;
- 37% позитивни резултати за *C. trachomatis* в менструална кръв, изследвани чрез real-time PCR „know how" методика.

В проучването на Michou и сътрудници [72], се съобшават данни за 25,3% инфектирани с *Chlamydia trachomatis* менструални тъкани, в сравнение с 18,3% позитивни цервико-вагинални биологични материали от една и съща група инфетилни жени. В друго изследване на свежи тъкани от ендометриум, фалопиеви тръби и яйчници, се детектира хламидиен генетичен материал в 56% от случаите на жени с ектопична бременност и 71% от пациентките със запушване на фалопиевите тръби [101]. Доказва се, че 65% от жените претърпели лапароскопия и негативна микробиология на долен генитален тракт, са с положителна хламидиална инфекция в горен генитален тракт. Данните сочат недвусмислено характерния тропизъм към горните отдели на женската полова система, което обяснява факта, че често бактериалната колонизация се насочва към таза, а цервикалните отдели остават негативни.

Тези данни още веднъж потвърждават, че водещо значение за диагностиката на хламидийна инфекция има избора на изходния материал за анализ, като при репродуктивни несполуки, ендометриалната проба трябва да е първи избор [102]. В обобщение може да подчертаем необходимостта от успоредно изследване за *Chlamydia trachomatis* на цервикална и ендометриална проба, с цел постигане на по-висока диагностична ефективност и обхващане на целия генитален тракт.

Установена е висока честота на ко-инфекция при пациентите с хламидия и други полово предавани патогенни микроорганизми с тропизъм урогенитален тракт, като: гонорея, микоплазми и уреаплазми [103-106]. Описаните бактериални инфекции се

характеризират със сходна клинична картина и аналогични усложнения при ненавременно откриване и лечение на болестта.

1.2.2.2. *Neisseria gonorrhoeae* и женско безплодие.

След хламидийната инфекция, *Neisseria gonorrhoeae* се приема като друг важен патоген, който се асоциира с репродуктивни несполуки. Запушването на маточните тръби вследствие от прекарана инфекция с *Neisseria gonorrhoeae* се характеризира с: двустранност на пораженията, проминиращи в ендосалпингеалния слой на яйцепроводите, облитерация в абдоминалните остриуми и липса на обемни перисалпингеални и периовариални сраствания. При този етиологичен фактор клинично се наблюдават три типа поражения на маточните тръби: гонореен салпингит, гонореен салпингоофорит и гонореен пелвиоперитонит. Разбира се прогнозата за тубарна патология, причинена от прекарана инфекция с *Neisseria gonorrhoeae* и появата на безплодие е пряко зависима от стадия на заболяването в който е започнало адекватно лечение.

Предвид преобладаващото симптоматично протичане на инфекцията с *Neisseria gonorrhoeae,* този патоген не е включен сред анализираните в настоящето проучване.

1.2.2.3. Роля на условно-патогенни генитални микоплазми (*Mycoplasma hominis/genitalium*/*Ureaplasma urealyticum/parvum),* като етиологичен фактор за женско безплодие.

Гениталните микоплазми се разделят на условно-патогенна група, представена от ***Mycoplasma hominis*/*Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum)*** и патогенен представител *Mycoplasma genitalium* [107]. Гениталните микоплазми са най-малките свободно живеещи, извънклетъчни бактерии, които се откриват в уро-гениталния тракт на бременни и небременни жени. Тези бактерии са с изразен тропизъм към мукоепителните клетки на уро-гениталния тракт.

Условно-патогенна група генитални микоплазми

Mycoplasma hominis*/*Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum представляват условно патогенни микроорганизми, които могат да причинят заболяване в организма при определени условия [108].

Условно-патогенните микоплазмени инфекции са широко разспространени сред сексуално активните жени, като най-висока е честотата на инфекция с *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* 40-80%, а с *Mycoplasma hominis* е 20-30% [109-111]. Присъствието им в долен генитален тракт се възприема за нормоценоза при условия на бактериално присъствие под 10^4. В резултат на нарушен цервико-вагинален баланс може да се наблюдава растеж на условно-патогенните микоплазми над 10^4, което се интерпретира като патологично състояние. Тези инфекции преобладаващо протичат безсимптомно, лесно

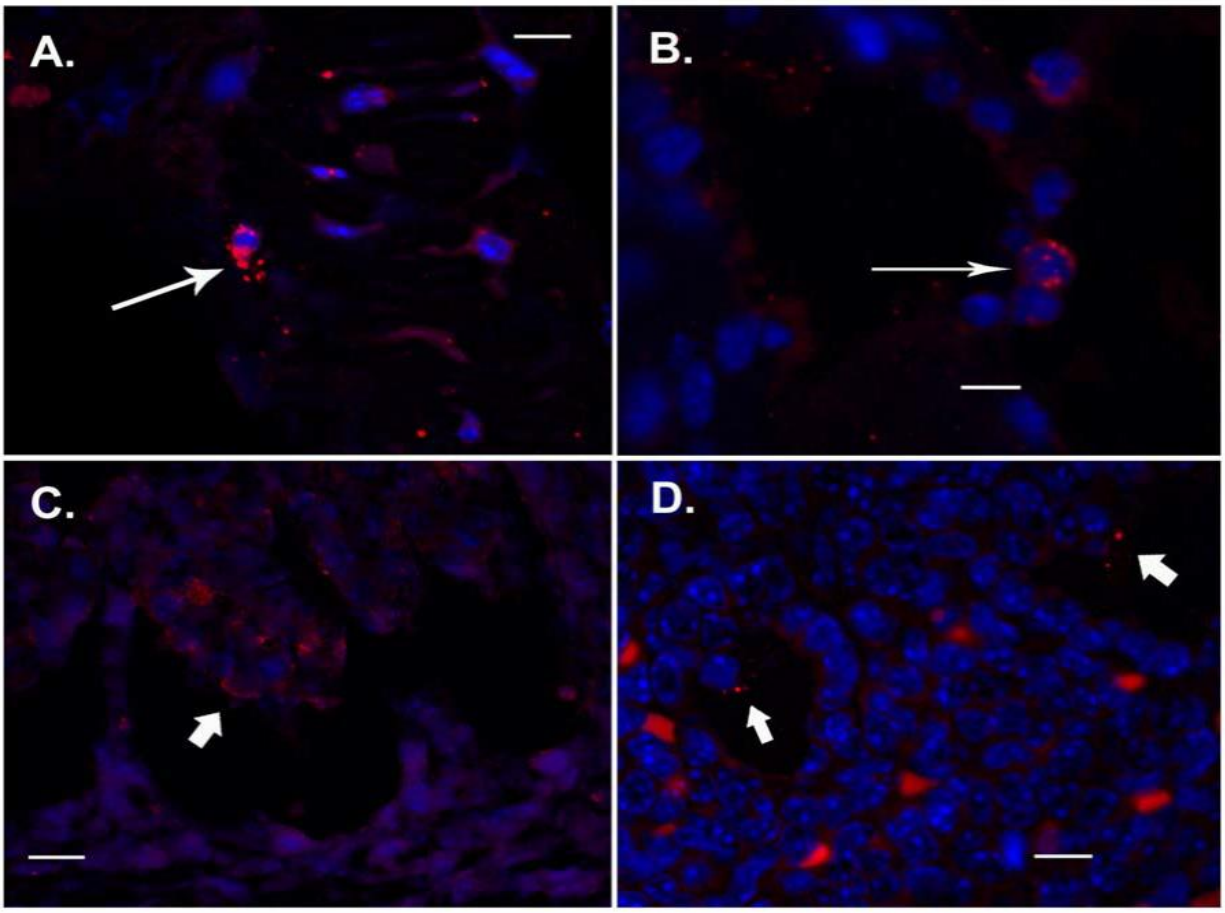
хронифицират и преминават към горните репродуктивни органи. Колонизацията на вагината или маточната шийка с генитални микоплазми може да доведе до възходяща инфекция към горните репродуктивни пътища с последващо възпаление на тези структури. Присъствието на генитални микоплазми във влагалищната и цервикалната лигавица не е сигурна предпоставка за настъпване на усложнения при бременността, тъй като инфекцията невинаги преминава към горните репродуктивни органи, но е установена зависимост между честотата на спонтанните аборти и присъствието на микоплазми и уреаплазми в ендометриалната тъкан, плацентата или амниотичната течност [112]. Присъствието им в горен генитален тракт е категорична патогенна находка, изискваща лечение. Персистиращото и често асимптомно инфламаторно състояние в горния генитален тракт може да причини характерни изменения на възпалени тъкани и да допринесе за развитието на нарушения на репродуктивната система, включително безплодие [108,113].

Трансмисията към горен генитален тракт протича чрез възходящо разпространение на инфекцията от долен тракт или директна вертикална трансмисия чрез заразена сперматозоидна фракция [114].

Асцендентната микоплазмена инфекция имитира горна хламидиоза, причинявайки: нехламидийни негонококови ендометрити, салпингити, тубарни сраствания, тазова-възпалителна болест. Нелекувани, аналогично на хламидията могат да предизвикат редица усложнения – трудности с концепцията, спонтанни аборти, вторичен инфертилитет, хориоамниотити, неонатални инфекции, инфекциозни артрити и ендокардити [115-117].

Mycoplasma hominis може да предизвика преждевременно раждане чрез активация на имунната система, водеща до повишена продукция на цитокини, простагландини, маточни контракции, дилатация на маточната шийка и преждевременно раждане поради руптура на фетални мембрани [113].

Ureaplasma urealyticum и *Ureaplasma parvum* са най-честите бактерии замесени в етиологията на хорионамнионит и типичните за него перинатални последици [118-120]. Хорионамнионита представлява възпалително заболяване на феталните мембрани с разнообразна патология, като бактериалната инвазия в амниотичната кухина е най-честата причина за патологичен процес [121]. Хорионамнионита може да предизвика най-често усложнения, като преждевременно разкъсване на мембраните, спонтанно преждевременно раждане, фетален инфламаторен синдром и за съжаление фетална смърт. И двете бактерии се идентифицират в: плацентарна тъкан [122], амниотична течност [123], фетална кръв и пъпна връв, фетален и неонатален бял дроб [124-125], цереброспинална течност [126], както и в гастро-интестинални аспирати (Фиг. 4.) [127-128].



[Von Chamier et al. 2012]

Фиг. 4. In situ детекция на U. parvum в плацентарни и фетални тъкани.
Представителни 2D проекционни изображения (600 x) на:

- Плацентарната хориодецидуална връзка (A)
- Вителинова мембрана (B)
- Фетално черво (C)
- Фетален бял дроб (D) /епицелуларно разположение/
-

В амниотичната течност на пациентки с хорионамнионит и/или фунизит обикновено се регистрират завишени концентрации на: *IL-1b, IL-6, IL-8* и *NNF α* [129-131]. При пациентки със същата клиника и/или наличие на преждевременно раждане и фетален синдром на възпалителния отговор се докалдват завишени стойности на калгранулините: *S100A, S100A9* и *S100A12* [132]. Факт е, че прекомерното локално възпаление в отговор на вътрематочна бактериална микоплазмена инфекция е пусков механизъм за преждевременно руптуриране на родилни мембрани, преждевременно раждане и/ или фетален синдром на възпалителния отговор. В описаната сложна каскада от процеси, отговорът на гостоприемника към развиващата се инфекция и патология се повлиява от специфичните му генетични фактори, определящи реакция към бактериална инвазия с интензивен възпалителен отговор и неблагоприятен изход от бременността по време на интраутеринна микоплазмена инфекция [133-142].

Няколко изследвания потвърждават присъствието и връзката на *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* с безплодие, като се докладват в гениталния тракт на безплодни жени и урогениталния тракт на стерилни двойки [143-144]. Публикуваха се категорични доказателства за редуцирана честота на успешни бременности чрез IVF процедури, вследствие на предходна колонизация с р. *Mycoplasma* на женски и/или мъжки генитален тракт [145]. Разпространението на *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* се докладва с еквивалентна честота (28-30 %) и (3-5%) от Miron *et al*. (Romania- 2013), Günyeli (2011- Turkey), Verteramo*et al*. (2013 - Italy) and Zdrodowska *et al*.(2006 - Poland) [146-148]. Не са отчетени значителни разлики в честотите на инфекция с таргетните бактерии независимо от географските и социални различия на изследваните популации.

Показателно е ретроспективното изследване на Tavo, et. al. 2013, проведено в Албания, където *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* са детектирани в 54, 3% и 30,4 % при безплодни пациентки, хоспитализирани поради спонтанен аборт [149].

Положителна асоциация на *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* със спонтанен аборт се потвърждава в турско проучване на Bayraktar и екип [150]. Те проследяват 50 бременни жени със симптоматична бактериална вагиноза и инфекция с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* до края на бременността, като за контролна група ползват благоприятен изход от бременността на 50 асимптомни бременни. Докладват се 12 случая на аборт, като в 8 от тях се детектира активна инфекция с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum.*

Allanson и сътрудници тестват 101 гестационни тъканни проби вследствие на аборт (хорион, амнион, пъпна връв) и детектират на първо място *Ureaplasma urealyticum* (25%) и на второ място по честота отново *Mycoplasma hominis* и *group B Streptococcus* (11,1%) [151].

Следват данни за детекция на генитални микоплазми в горен генитален тракт. Отново Michou и сътрудници изнесоха данни за генетичен материал от *M. hominis* и *U. urealyticum,* детектиран в 13.7% и 18.3% в менструална тъкан на инфертилни жени. В изследването на Witkin и екип [152] с PCR върху вагинални секрети от жени, претърпели *in vitro* пложданe, се докладва честота на инфекция с *U. urealyticum*: 17,2%. Mousavi и сътрудници откриват микоплазмени инфекции при стерилни жени, с неизяснена причина, използвайки ендоцервикални проби. Докладват 37,5% инфектирани с *U. urealyticum* жени [153].

Наблюдава се висок процент (28,5%) на успешна репродукция след терапевтично потушаване на уреаплазмени инфекции (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) при много двойки с продължителен стерилитет [154].

Bartkeviciene и екип правят детайлна оценка върху това дали уреаплазмените инфекции са свързани с усложнения на бременността и неонатална заболеваемост. Доказват недвусмислено, че р. *Ureaplasma* може да повлияе на преждевременното изтичане на фетална амниотична течност и се свързва с плацентарно възпаление, дори и с респираторен дистрес синдром на новороденото [122, 155-156].

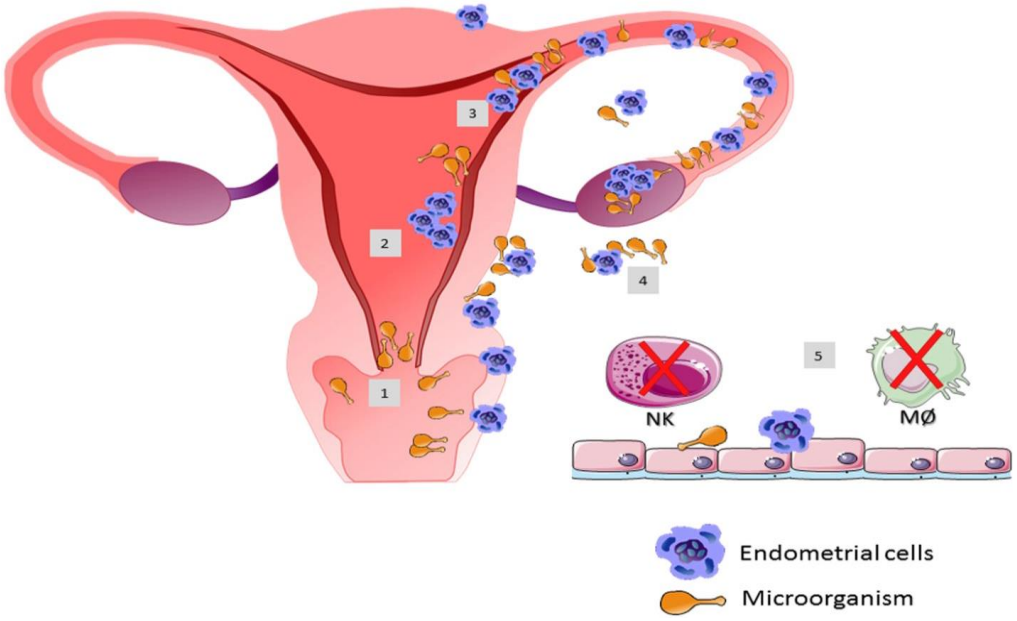
Въз основа изнесените данни, категорично можем да заключим за необходимостта на ендометриална оценка на инфекциозен статус по отношение на генитални микоплазми.

1.2.2.4. Роля на *Mycoplasma genitalium* за женско безплодие.

Mycoplasma genitalium е патоген, който се свързва доказано с безплодие поради анормалности във фалопиевите тръби (22%) [157].

Mycoplasma genitalium представлява типична полово-предавана бактерия, която причинява уретрити, цервицити, тазово-възпалителна болест и почти винаги се развива безсимптомно [158]. Безсимптомното протичане на инфекцията и асцендирането и към горен тракт се обуславя от изяснен механизъм.

Campos и сътрудници докладват профил на понижена регулация на гените, свързани с възпалителен отговор при инфекция с *Mycoplasma genitalium* в клетките на перитонеалната течност на жени с ендометриоза. Авторите допускат, че *Mycoplasma genitalium* играе ключова роля в процеса на имунна толерантност и описват механизма при колонизация на женски генитален тракт (Фиг.5.) [159].



[Campos et al. 2018]

Фиг.5. Схема на каскада от събития, настъпващи в таза с ретроградна менструация и влияние на *Mycoplasma genitalium* върху имунния отговор.

- Микроорганизмите (*Mycoplasma genitalium)* могат да колонизират, инфектират и персистират в долния генитален тракт, което води до генитални нарушения или асимптоматични инфекции.
- Микроорганизмите (*Mycoplasma genitalium)* асцендират до горните репродуктивни отдели и инфектират маточната кухина.
- Ретроградната менструация може да пренесе ендометриални клетки и микроорганизми до фалопиевите тръби, яйчниците и перитонеалната кухина.

- Достигайки перитонеалната кухина, ендометриалните клетки могат да се прикрепят към перитонеалните повърхности и да нахлуят в близките структури. Лезиите и микроорганизмите активират макрофагите (МØ) и стимулират секрецията на провъзпалителни цитокини (*IL 1β, IL-8, IL-6* и TNF-α).
- Освен набирането на естествени клетки убийци (NK) и МØ, тези клетки НЕ реагират имунно, вероятно поради бактериално обусловено потискане на няколко гена, свързани с имунно активиране и рецептивност на локално ниво. По този начин микроорганизмите и ендометриалните клетки си сътрудничат, оставайки в перитонеалната кухина чрез отрицателна регулация на имунната система.
- Финален резултат от описаната каскада от събития е понижена имунна реактивност и изявена толерантност към инфекцията с *Mycoplasma genitalium.*
-

В съвременно проучване на база мета-анализ се докладва за категорична връзка на *Mycoplasma genitalium* с цервицит, тазово-възпалителна болест, преждевременно раждане, спонтанен аборт и безплодие, и с приблизително двукратно увеличение на риска за тези здравословни проблеми [73]. Данни от серологични проучвания “case-conrol” и мета-анализи върху клинични изследвания показват потенциална роля на *Mycoplasma genitalium* в причиняването на безплодие [160-162].

Инфекция с *Mycoplasma genitalium* се детектира при 10–30% от жените с клиничен цервицит [163]. Разпространението на *Mycoplasma genitalium* е по-високо при пациентки с тазово-възпалителна болест и позитивната инфекция почти винаги е индикатор за патологични състояния и проблеми с естествената концепция [164]. *Mycoplasma genitalium* се детектира в шийката на матката или ендометриума на жени с тазово-възпалителна болест по-често, отколкото при жени без. Сред жени с наличие на тазово-възпалителна болест честотата на разпространение на *Mycoplasma genitalium* варира от 4% - 22%, като се докладва завишена честота 60% в проучване върху жени с тазово-възпалителна болест след аборт [165].

Спорна е асоциацията на тази бактерия със загуба на бременност. Провежда се мащабно “case-conrol” проучване в САЩ върху 392 пациентки с наличие на един или повече спонтанни аборти преди 22 гестационна седмица и 802 здрави бременни жени под формата на контролна група върху връзката на бактерията със спонтанни аборти. Докладвана е позитивна инфекция с *Mycoplasma genitalium* при 5,9% от пробандите, както и липса на позитивна асоциация на бактерията със спонтанен аборт [166].

Въпреки многобройните проучвания доказателствата за ролята на инфекцията с *Mycoplasma genitalium* по време на бременност, като възможна причина за перинатални усложнения, включително преждевременно раждане, спонтанен аборт или ниско тегло при раждане, са противоречиви и има нужда от по-категорични резултати и унифицирани изследвания в перспектива [167-168]. Данните за извънматочна бременност и неонатална инфекция с *Mycoplasma genitalium* са ограничени [169].

Предвид явната асоциация на Mycoplasma genitalium с ендометриални аномалии и проблеми с концепцията, изследването му в проби с цервикален и ендометриален произход е обосновано при пациентки с идиопатично безплодие. Друг важен момент е, че PCR диагностиката е единствен клинично приложим метод за детекция на патогена.

1.2.2.5. Роля на *Gardnerella vaginalis* за женско безплодие.

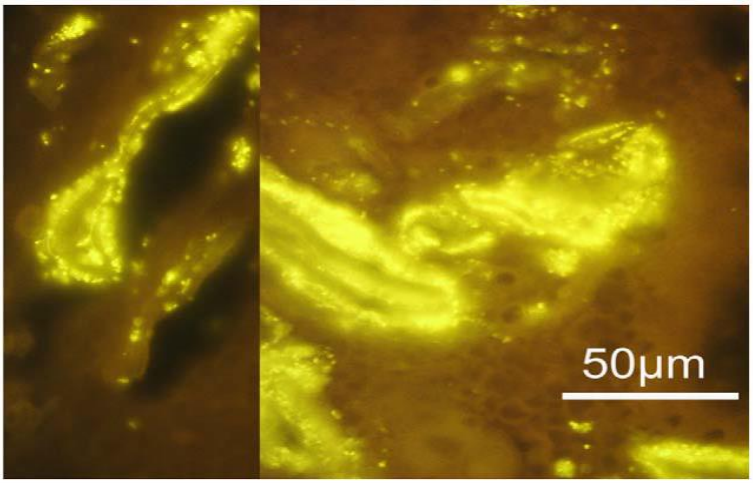
Бактериалната вагиноза е една от най-честите вагинални инфекции на долния генитален тракт, която се среща сред жени в детеродна възраст и причинява вулвовагинален дискомфорт [170]. Състоянието често е асимптоматично, но спрямо находката може да се характеризира с един или повече от следните симптоми: хомогенен вагинален секрет със сиво-бял цвят, промяна в pH на влагалището в диапазона 4.5-7.0, неприятна миризма на риба. Бактериалната вагиноза е резултат от нарушаване на естествения баланс между микроорганизмите, съставляващи нормалната влагалищна микрофлора и условно патогенните микроорганизми. Наблюдава се драстично намаляване на количеството на лактобацилите във влагалището за сметка на интензивен растеж на различни видове грам отрицателни и строго факултативни анаеробни бактерии, от които най-често *Gardnerella vaginalis* и гениталните микоплазми – *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum*. Освен с изброените микроорганизми, с диагнозата често се свързват и: *Megasphaera spp., Atopobium vaginae, Dialister spp., Mobiluncus spp., Sneathia amnii, Sneathia sanguinegens, Porphyromonas spp., Prevotella spp* [171].

Gardnerella vaginalis е преобладаващата бактериална находка в случаите на бактериална вагиноза. Като основна причина за бактериална вагиноза се посочва дисбаланс на киселинността на влагалището, който позволява на анаеробните бактерии да се развиват. Бактериалната вагиноза често протича с формирането на плътен, структуриран полимикробен биофилм, състоящ се основно от *Gardnerella vaginalis,* силно прилепнал към вагиналния епител [172]. Описаната характерна структура обяснява рекурентната природа на тази патология, което важи и за други инфекции, формиращи биофилм [173]. На практика, формиращите се структурирани биофилми протектират бактериите, свързани с бактериална вагиноза от анимикробните лекарства. Това определено допринася за персистенцията, както и резистентност към антибактериални лекарства или повторното инфектиране посредством партньора. Въпреки доста ефикасните стандартни и персонализирани лечения, бактериалната вагиноза представлява силно рецидивиращо патологично състояние, което се повтаря при ~ 58% от жените в рамките на една година [174].

Много доказателства сочат, че патогенните ефекти на бактериалната вагиноза не се ограничават до долен генитален тракт. На практика бактериалната вагиноза е строго асоциирана с късна загуба на плода и преждевременно раждане [175-177], вероятно поради асцендираща инфекция към горните отдели на женски генитален тракт. Andrews и сътрудници докладват за логична връзка между бактериалната вагиноза и повишената честота на ендометриална колонизация с микроорганизми, асоциирани с бактериална вагиноза [178]. Сред пациентките с безплодие се докладват значително висока честота на бактериална вагиноза, както и повишен риск от загуба на бременност, свързана с патологичното състояние.

Теорията за ендометриалната колонизация при наличие на бактериална вагиноза е много добре анализирана и потвърдена в проучването на Swidsinski и екип. Докладват

наличието на структуриран полимикробен биофилм в ендометриума с доминираща бактериална фракция *Gardnerella vaginalis* при повече от половината пациентки в извадката с анамнеза за аборт и/или бактериална вагиноза (Фиг.6.) Наличието на резервоар с изобилие от потенциално патогенни бактерии, конфигурирани в биофилм, прикрепен към ендометриума в непосредствена близост до миометриума и амниотичния компартмент има ключова роля за патогенезата на нежизнеспособна бременност и/или неблагоприятен изход.



[Swidsinski et al. 2013]

Фиг.6. Ендометриална колонизация чрез доминиращ с *Gardnerella vaginalis* полимикробен биофилм.

- Пролифериращ *Gardnerella vaginalis* доминиращ биофилм с фоликуларен (ляво изображение) и лутеален (дясно изображение) ендометриум.

Еквивалентни резултати се наблюдават в проби от фалопиеви тръби от жени, подложени на салпингектомия. Наличието на интензивна бактериална вагиноза в матката, или т.нар. „гарднерелоза“ се оказва от значителна важност за заболеваемостта, свързана с тази патология, както и с неблагоприятен изход от бременност. От направените наблюдения става ясно, че както вагиналния, така и ендометриалния полимикробен биофилм може да присъства продължителен период от време абсолютно безсимптомно [74]. Swidsinski и работната му група определят 50% риск (95% CI 27-76.0) от развитие на ендометриален биофилм с доминираща бактериална фракция с *Gardnerella vaginalis* при пациентките с бактериална вагиноза. Наличието на бременност и бактериална вагиноза се оказват високо прогностични за наличие на вътреутеринна колонизация, обхващаща и маточните тръби в сравнение с небременни жени без бактериална вагиноза.

Бактериалната вагиноза категорично се асоциира с повишен риск от безплодие и най-вече тубарно безплодие [179]. При жени, подложени на *IVF*s се установява, че серопозитивност по отношение на *Chlamydia trachomatis* и наличие на бактериална вагиноза се асоциират строго и независимо с тубарно безплодие [180]. В извадка с пациентки, подлежащи на лечение на безплодие, диагнозата бактериална вагиноза се установява при 31, 5% от жените с тубарно безплодие, а също и при 19,7% с нетубарен стерилитет [181]. Интересен факт е, че идиопатичното безплодие се свързва с уникален вагинален

бактериален профил, който задължително включва, като проминираща компонента бактерии, асоциирани с бактериална вагиноза [182]. Мета-анализи докладват за 3.3 пъти по-висока вероятност за идентифициране на бактериална вагиноза при стерилни жени, отколкото при антенални такива в рамките на една и съща популация. Докладваната честота на разпространение на бактериална вагиноза сред пациентки, подложени на IVFs от мета-анализите варира в широк диапазон (4-38%). Изнесените данни, индикират голяма хетерогенност в проучванията вероятно поради различни диагностични методи, етноси, видове безплодие и др.

Основен трансмисивен механизъм на бактериалната вагиноза към горен генитален тракт е ефекта на сиалидазата и други муцинази върху интегритета на цервикалната слуз. Първичната функция на цервикалната слуз в женския репродуктивен тракт е защита на горните отдели от инвазия на микроорганизми. За да преодолеят слузната бариера микроорганизмите могат да синтезират набор от хидролизиращи ензими, включително муциназни, способни да разграждат муцини. Синтезираните ензими имат способността да стимулират бактериалната адхезия и последваща колонизация на женски горен генитален тракт [183]. По този начин се подпомага колонизацията на горен репродуктивен тракт и склонността за развитие на заболяване с тази локализация в бъдеще, включително безплодие.

Веднъж установената ендометриална колонизация на бактериите, асоциирани с бактериална вагиноза с доминираща фракция от *Gardnerella vaginalis* и последващо възпаление могат да доведат до понижена плодовитост/ редуцирана фертилност. Експерименталните доказателства подкрепят значението на бактериалните ендотоксини за инициране на каскада от провъзпалителни реакции срещу инфекцията. Микроорганизмите, свързани с бактериална вагиноза доказано предизвикват имунна активация чрез повишаване на нивата на провъзпалителни цитокини, водещи до възпаление лигавицата на гениталния тракт [184-187]. Завишени нива на цервикални интерлевкини *IL-1b, IL-6, IL-8* са докладвани при жени с бактериална вагиноза и инфертилитет [188]. Именно тези комплексни имунологични механизми са отговорни за неуспешна имплантация, спонтанни аборти, преждевременно раждане, свързано с инфекция/възпаление и фетално увреждане.

В обобщение можем да заключим за важността на бактериалния фактор за репродуктивното благополучие. Важен момент е, че всяка бактериална инфекция от гореспоменатите обуславя повишена податливост към инфекция и развитие на други полово-предавани патогени, включително и такива без асоциация към репродукция, но значими за интимното здраве, като човешки папиломни вируси (ЧПВ), *HIV* и др. [189-192].

Социалната значимост на репродуктивно-профилактични и клинично-обусловени изследвания от спектъра на застъпените в настоящият труд бактерии е безспорна, като провеждането на диагностиката върху цервикални и ендометриални проби подсигурява цялостна оценка на гениталната система по отношение на таргетния инфекциозен статус.

1.2.3. Вирусни фактори замесени в етиологията на безплодие.

Вирусните инфекции са отговорни за ~ 80% от понижената инфекциозно обусловена фертилност сред двойките. Вирусите са най-често замесените патогени, свързани с репродуктивни несполуки, включително цялото семейство човешки херпесни вируси *сем. Herpesviridae*, прицелни за настоящата разработка.

1.2.3.1. Роля на сем. *Herpesviridae* за безплодие.

Human Herpes viruses *(HHV)* включват набор от патогенни вируси, които след първична инфекция остават в латентно състояние в организма на гостоприемника и подлежат на мултисайтова реактивация в периоди на имуносупресия [193]. Реактивирани херпесни вирусни инфекции могат да доведат до трансмисия към ендометриума и/или ооцита. В допълнение, всички човешки херпесни вируси са установени и в семенната течност, което прави еякулата също източник за ендометриална инфекция. Още повече, тази група вируси са изключително устойчиви дори след пречистване на сперматозоидите чрез центрофугиране в плътностен градиент за целите на in vitro оплождане.

Ендометриалната вирусна инфекция се свързва с нарушение в процесите на децидуализация, трофобластна инвазия, повишена тромбогенна активност, неонатални инфекции, имуногенност и антигенност на зародиша, което отключва майчин имунологичен отговор на отхвърляне по време на бременността, ранни и късни спонтанни аборти [194-195].

1.2.3.2. Роля на Човешки херпес вирус *HSV* за женско безплодие.

За два от членовете на сем. Herpesviridae, ***HSV-1*** **и** ***HSV-2,*** след първична инфекция**,** се установява латентност в невронните клетки, като при реактивация могат да причинят генитален или лабиален херпес, като клинична изява [196].

Гениталната първична или вторична инфекция крие риск от вертикална трансмисия към ендометриума и плода, водеща до вариации от репродуктивни проблеми.

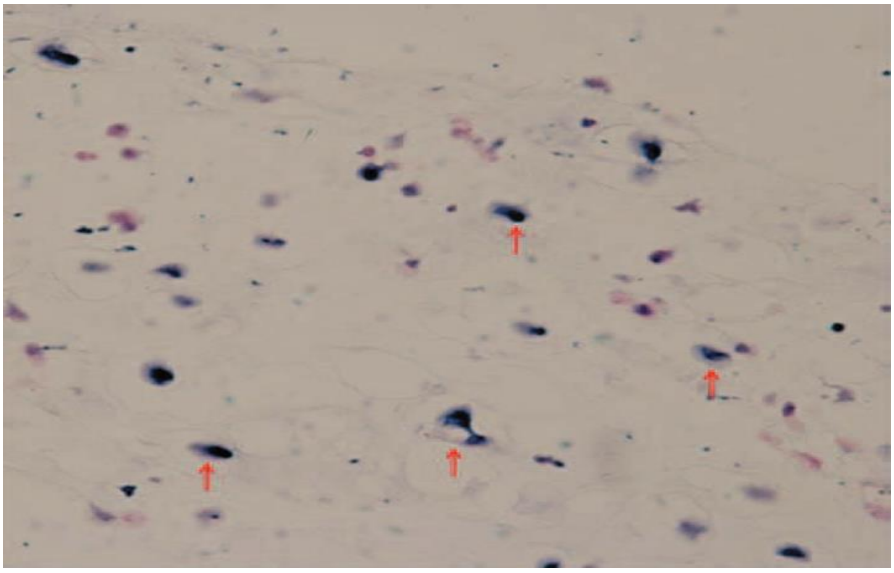
Масираната ендометриална инвазия с *HSV* се случва и чрез заразена с вируса семенна течност, която е резервоар на латентна безсимптомна *HSV* инфекция. Инфекции с херпесното вирусно семейство оказват директен негативен ефект върху сперматозоидите при мъже и индиректен върху женски генитален тракт и имплантирания новообразуван ембрион чрез механизма на вертикална вирусна трансмисия по време на оплождането [197]. Докладвани са забележителен брой случаи, при които вируса често може да се предаде към ендометриума по време на полов акт [198-200], като няма сигурно детерминиран критичен *HSV* вирусен товар за осъществяване на вирусна трансмисия от позитивни мъже към партньорките им.

Според литературните данни първичната инфекция с *HSV* през втори или трети триместър на бременността се асоциира с преждевременно раждане, аномалии на плода и късен аборт, докато рекурентната инфекция носи по-нисък риск за ембриона, фетуса и новороденото [201-202]. Въпреки първоначалните епидемиологични проучвания, връзката

на инфекцията с *HSV* (*HSV-1* и *HSV-2)* със загуба на бременност през първия триместър не е напълно изяснена.

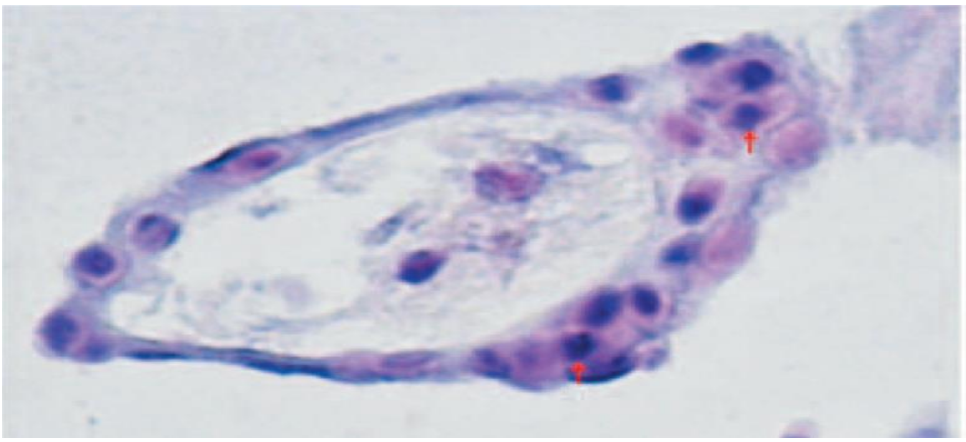
El Borai и екип откриват чрез PCR наличие на активна инфекция с *HSV* в менструална кръв при повече от половината изследвани безплодни жени в тяхното проучване. Почти всички положителни пробанди имат по няколко неуспешни in vitro фертилизационни опити, като за основна причина се приема вторичната реактивация на *HSV*, след оплождането в резултат на хормонална стимулация [203]. Реактивацията на *HSV*s вследствие от хормонална стимулация се докладва, като честа причина за неуспешни in vitro фертилизационни опити и от други екипи. Безплодие, асоциирано с положителнен тест за *HSV* се наблюдавана при мъжете (p = 0,024), като явната връзка се подчертава поради настъпила неуспешна IVF процедура (p = 0,0086).

В информативното си проучване Nikiforos Kapranos и екип изследват чрез PCR и "in situ" хибридизационни техники наличието на *HSV-1* и *HSV-2* в гестационни тъкани при 95 жени със спонтанен аборт в първи триместър и 36 жени с планово прекъсване на бременността. ДНК на *HSV* се детектира в 41/95 (43,2%) случая на ранна загуба на бременност и в 6/36 (16,7%) случая на планово прекъсване на бременност (p=0,03). Позитивните случаи на активна инфекция с *HSV* при ранна загуба на бременност се наблюдават при аборти между 6- 12$^{-та}$ гестационна седмица, но най-често през 6/8/9-^{та} гестационна седмица. В 18/25 (72%) позитивни за *HSV*, детектирани чрез PCR случая, "in situ" хибридизацията показва, че сигналът е локализиран предимно в ядрата на децидуалните и междинните трофобластни клетки и по-рядко в трофобластните клетки на хорионните въси, което демонстрира пряка връзка на вируса с процеса на имплантация (Фиг. 7 и 8.) [204].



[Kapranos et al. 2009]

Фиг. 7. *HSV* детекция в гестационна тъкан при случай на мисед чрез „in situ" хибридизация. *HSV* ДНК е локализирана в ядрото на децидуалните и междинните трофобластни клетки (червени стрелки).



[Kapranos et. al. 2009]

Фиг. 8. "In situ" хибридизация в случай на мисед, показваща хорионови структури с *HSV* ДНК, локализирана в ядрото на цитотрофобластните и синцитотрофобластните клетки (червени стрелки).

Локализацията на *HSV* ДНК в ядрата на децидуалните клетки подсказва възможно повторно активиране на съществуваща предишна ендометриална инфекция. Реактивацията се интерпретира, като резултат от временното отслабване на имунитета [205]. Реактивацията на *HSV* в ендометриума може да бъде свързана с последващо повишаване активността на NK клетките и/или *Th1/Th2* цитокинов дисбаланс, което обуславя загуба на бременност [206]. *HSV* може също да бъде свързан с индукция на апоптоза в децидуални и трофобластни тъкани, което се подкрепя от някои учени, като възможен механизъм за спонтанен аборт. Не на последно място тромбогенния ефект, причинен от *HSV* върху утероплацентарните съдове, води до нарушение на кръвообращението и не може да бъде изключено като механизъм на спонтанна загуба на бременност. Тази теория се подкрепя и предвид факта, че *HSV* има способността да причинява производство на тромбин и ендотелно увреждане [207-208].

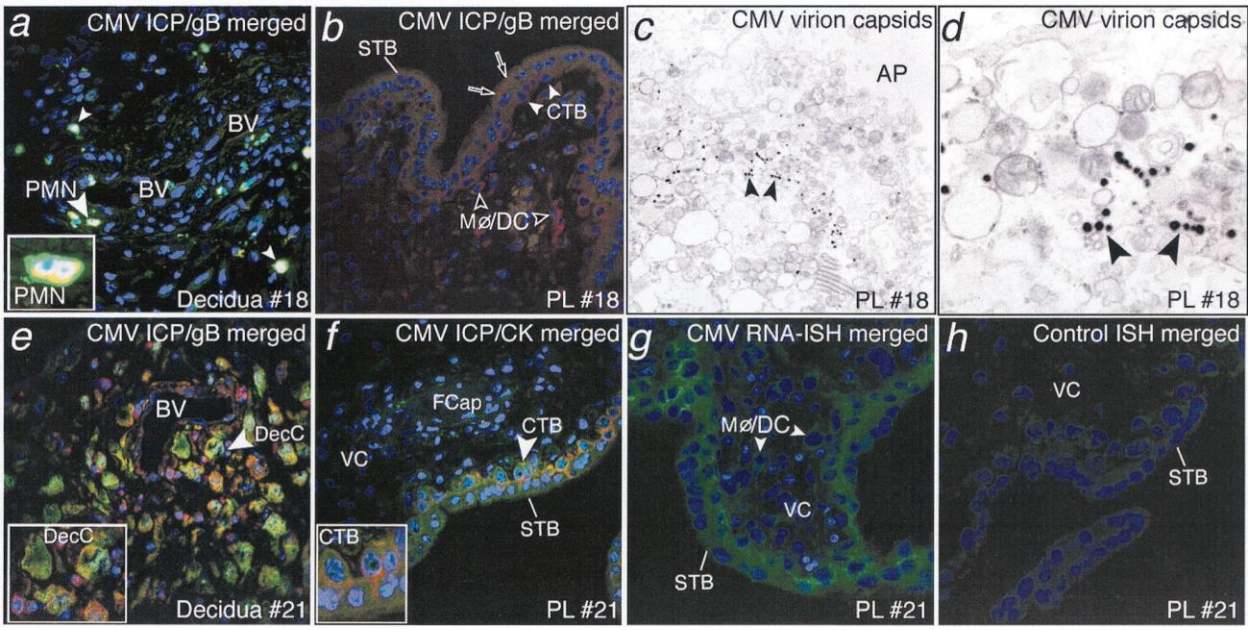
Изводите потвърждават важната роля на инфекцията с *HSV* при загуба на бременност и дават гласност за необходимостта за *HSV* диагностика при двойката чрез използване на прецизни и чувствителни молекулярни техники. Често ендометриалните инфекции с *HSV* биват подценявани поради недиагностициране. Скрининговият диагностичен подход би благоприятствал успешна бъдеща бременност чрез приложение на бърза антивирусна терапия.

1.2.3.3. Роля на Човешкият цитомегаловирус (*CMV*) за женско безплодие.

Човешкият цитомегаловирус (*CMV*) представлява повсеместно разпространен вирус, който предизвиква асимптоматични инфекции при здрави индивиди. Битови навици и сексуални контакти са основни рискови пътища за заразяване, като възрастните индивиди масово са серопозитивни [209-211]. Разнообразни органи и клетки са податливи на инфекция с *CMV* [75]. Латентната инфекция с вируса се установява в прекурсорите на гранулоцитните макрофаги [212].

Вродената *CMV* инфекция е най-честата в цял свят, като се среща при 1:150 живородени деца. Приблизително 10% от новородените с конгенитална инфекция с вируса имат симптоматични прояви при раждането, като вътреутробно забавяне в растежа, хепатомегалия и микроцефалия, които могат да доведат до усложнения на неврологичното развитие, включително умствена изостаналост и сензоневрална загуба на слуха [213]. При първична инфекция на бременна с *CMV,* рискът от фетална инфекция по оста майчино кръвообращение - плацента - фетус се оценява над 30 %. Наличието на *CMV* в мъжки генитален тракт подсказва възможността и от вертикална трансмисия на вируса, чрез сперматозоидите към женския генитален тракт. Въпреки че, наличен майчин имунитет срещу *CMV* намалява значително риска от симптоматично конгенитално заболяване на фетуса, вертикалното предаване от цервикално локализиран реактивиран в майката вирус към плода или чрез инфектиран мъжки фактор е рисков фактор за фетуса (0.1-0.3%). Реактивиран латентен вирус може да доведе до симптоматична вродена инфекция и при родени от *CMV* имунокомпетентни майки, особено при такива с нисък авидитет на имуноглобулин G [214]. Следва да се подчертае, че голяма част от пренатално настъпилите *CMV* инфекции приключват със спонтанен аборт и остават извън гореизложената статистика.

В допълнение, редица медицински данни сочат и за имплантационни нарушения вследствие на *CMV* инфекция. *CMV* се реплицира в различни децидуални клетки, плацентарни трофобласти и капиляри (Фиг. 8.) [215]. ДНК последователности от *CMV* и вирусни протеини са открити по-често децидуално отколкото в плацентата. Това наблюдение подсказва, че именно матката функционира, като латентен резервоар за инфекции.



[Lenore Pereira et al. 2003]

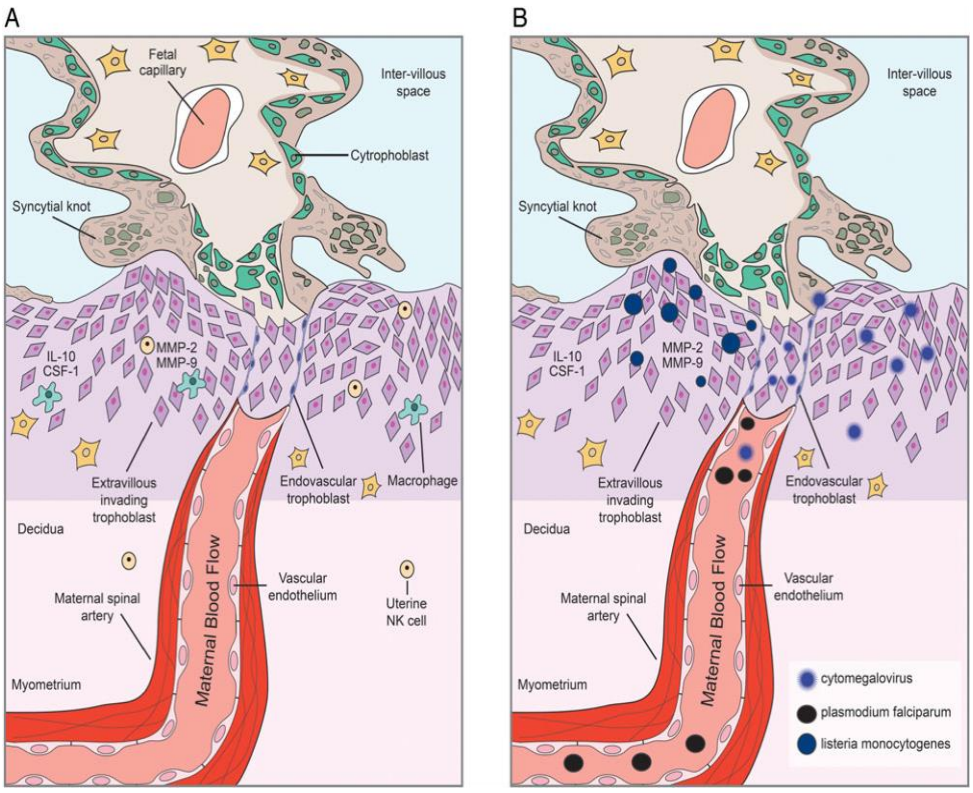
Фиг.8. Репликация на *CMV* вириони в плацентата.

а). Децидуа, експресираща *CMV*-инфекциозни клетъчни протеини (ICP).

b). Прилежаща плацента с *CMV* съдържащи gB-оцветени везикули в синцитиотрофобласти (STB) и Мф/DC (=Hofbauer cells) във вътрешността на вилите.
c). и d). Електронни микрографии на плацента, съдържаща *CMV* вирионни капсиди, групирани близо до апикалната (AP) повърхност на синцитиотрофобластната мембрана STB.
e). Децидуа, експресираща *CMV* протеини в децидуални клетки и маточни кръвоносни съдове (BV).
f). Плацента, съдържаща инфектирани цитотрофобластни прогениторни клетки CTB и инфектирани фетални капиляри (FCap).
g). и h). Флуоресцентна „in situ"- хибридизация, показваща *CMV*-специфична реакция и отрицателна контрола за наличие на ранни *CMV* РНК транскрипти в трофобластните слоеве на плацентарната повърхност и Мф/DC (=Hofbauer cells) във вътрешността на вилите.

Чрез „in vitro" изследвания се доказва репликацията на *CMV* в трофобластни клетки (Фиг. 9 B) [216]. В трофобластите *CMV* може да предизвика възпалителен отговор, което инициира апоптозата и обуславя отключването на плацентарна дисфункция [217]. *CMV* доказано активира *TNF-α,* което води до клетъчна смърт, като *TNF-α* обикновено се експресира в ниски нива от плацентата [218-219]. *B* инфектирани с *CMV* пациенти понижените нива на матриксните металопротеинази *MMP2* и *MMP9,* свързани с имплантацията при ранна бременност, индикират наличие на компроментирана имплантационна способност, което може да резултира в спонтанен аборт.

В обобщение, докладваните данни сочат, че *CMV* инфекцията категорично води до имплантационни затруднения, плацентарна дисфункция, респективно фетална инфекция, резултираща в определени случаи в спонтанен аборт [220].

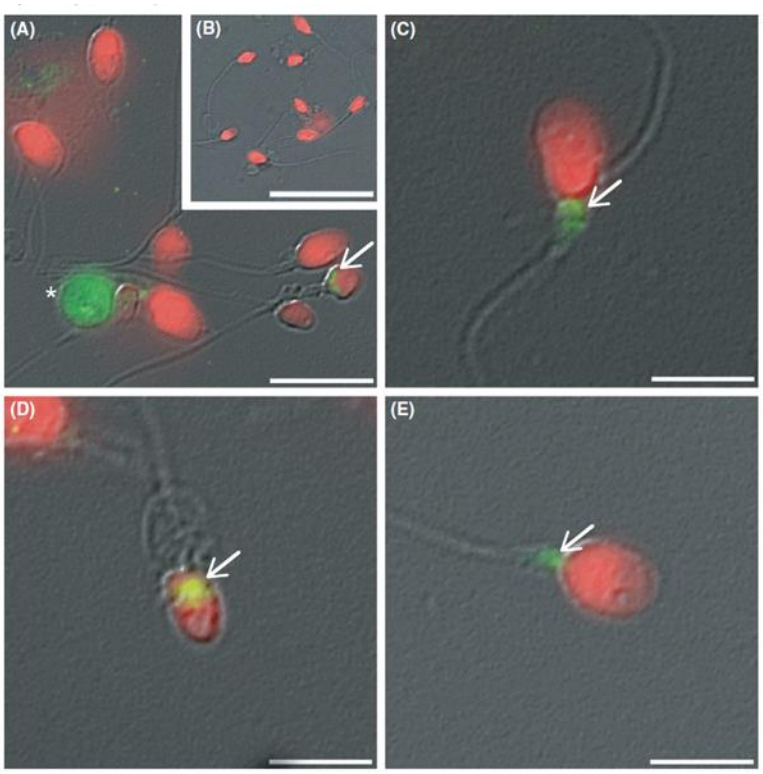


[Sevi Giakoumelou et al. 2016]

Фиг. 9. Здрава (A) и инфектирана (B) фето-плацентарна единица.

А). По време на здрава бременност, взаимодействието между майчината децидуа, васкулатурата и имунните клетки (макрофаги, маточни NK клетки и дендритни клетки) с феталните трофобласти и синцитиални клетки е от съществено значение за поява и прогресия на бременност. Молекули като *IL-10, CSF-1* и трансформиращ растежен фактор-b имат възлова роля за трофобластната инвазия по време на имплантиране и се експресират от маточните клетки.
В). *CMV* инфекциите могат да нарушат баланса на фето-плацентарните взаимодействия.

В допълнение на *CMV* индуцираните репродуктивни нарушения при жени, следва да се упомене и негативната роля на вируса по отношение на мъжката оплодителна способност. Чрез имунофлуоресценция на сперматозоиди от инфектирани клинични проби и „in vitro“ инфектирани клетки се откриват вътреклетъчно локализирани *CMV* специфични белтъчни сигнали, локализирани в главите, опашките и свързващите части на сперматозоидите (Фиг. 10.). *CMV* инфламаторно състояние и ефекта на вируса върху качеството на сперматогенезата чрез гаметотоксичност може да доведе до мъжки стерилитет [76].



[V. Naumenko et al. 2014]

Фиг. 10. Имунофлуоресцентна локализация на *CMV* pp65 протеин в клинични проби. *CMV* pp65 протеин (стрелки) се визуализира в:

- **Главите на сперматозоидите (A, D)**
- **Свързващи части (C, E) на физиологичните сегметни на сперматозоидите**
- **В контролата не е открит вирус (B)**
- *** - Положително оцветена несперматозоидна клетка е маркирана със звездичка**

Предвид широкото разпространение на *CMV* в глобален мащаб, явната му асоциация с проблемна имплантация, спонтанни аборти и неонатални инфекции и директния му

гаметотоксичен ефект върху сперматозоидите, изследване на двойки за присъствие на вируса е препоръчително да бъде част от репродуктивната диагностична практика.

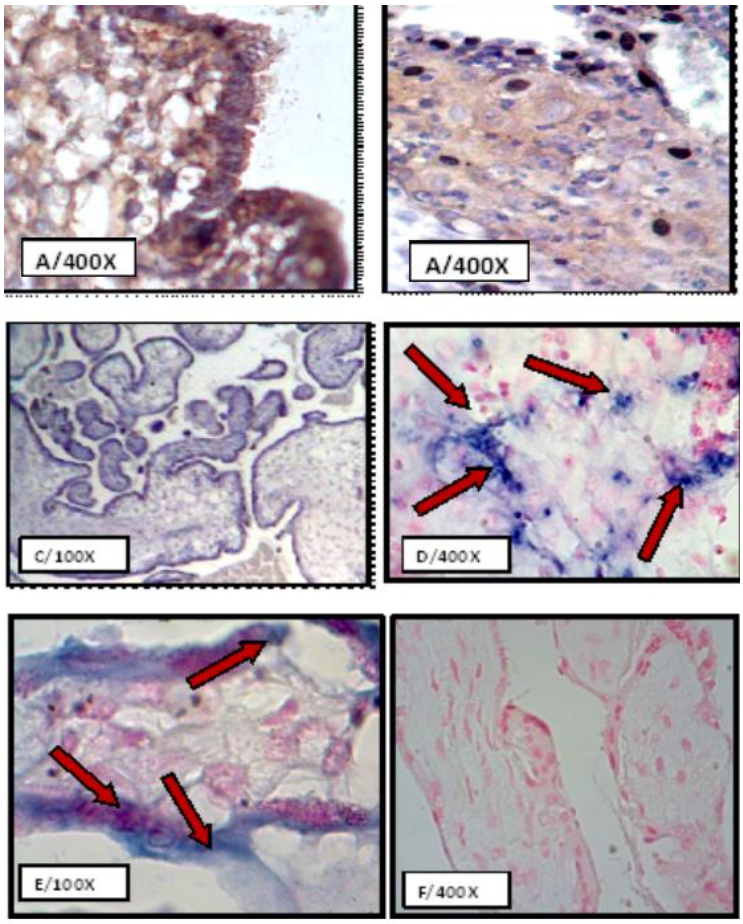
1.2.3.4. Роля на Човешкият Епщайн-Бар вирус (*EBV*) за женско безплодие.

EBV е член на семейството на гама херпесните вируси, който причинява инфекциозна мононуклеоза. *EBV* е с доказан онкогенен потенциал и участник в няколко злокачествени заболявания - Лимфом на Бъркит и лимфоепителиом-подобен карцином [221].

EBV е повсеместен вирус със серологично разпространение над 90% при възрастното население. Въпреки основния въздушно-капков път на трансмисия се счита, че може да бъде и полово предаван патоген. В-лимфоцитите представляват първичните клетки-гостоприемници на вируса. Независимо от тази класическа локализация, *EBV* се детектира също в семенна течност, женски долен и горен генитален тракт, менструална тъкан и др. [222].

Наличието на *EBV* в цервикални проби на 112 жени с полово-предавани инфекции се докладва в 8,9 % от шведски изследователи [223], докато в по-ранно изследване на M. Berntsson в клиника за полово предавани инфекции се демонстрира наличие на *EBV* в цервикални проби в 38 %. Италиански изследователи докладват наличие на ДНК на *EBV* в маточната шийка на здрави жени (17 -70г.) в 18-19% от случаите [224]. Разлики в честотата на *EBV* в различните възрастови групи не са докладвани.

Познанията за перинатална инфекция с *EBV* са ограничени. Реактивация по време на бременност се съобщава при 35% от позитивните жени за *EBV*. Ali Hattem Bayati и екип проверяват потенциалното съществуване на плацентарни инфекции с *EBV* и *CMV* при жени с рекурентни аборти чрез имунохистохимия и “in situ” хибридизация. В изследваните плацентарни тъкани се детектира *EBV* в 22,5 % чрез два метода: хромогенна „in situ” хибридизация и имунохистохимично. *CMV* се детектира в следните проценти и с двата метода 30% и 37,5%. Екипът прави заключение, че *EBV* и *CMV* представляват важни фактори за плацентарна инфекция сред жени със спонтанни аборти, като *CMV* се детектира и в здрави контроли [225]. *EBV* може да причини инфекция на плацентата при бременност с последващи усложнения за фетуса. Доказано е, че са възможни, както първични така и вторични инфекции с вируса по време на бременност. Въпреки това първичната инфекция с очевидна *EBV*-трансплацентарна трансмисия е рядка, докато вторичната майчина инфекция не е необичайна (Фиг. 11.) [226].



[Ali Hattem Bayati et al. 2017]

Фиг. 11. Микрофотография с оцветяване на трофобластни плацентарни тъкани от пациенти със спонтанен аборт (червени стрелки):

A. *EBV* имунохистохимично оцветяване, повишен интензитет на клетъчното ядро.
B. *CMV* имунохистохимично оцветяване, повишен интензитет на клетъчното ядро.
C. Негативно имунохистохимично оцветяване за *EBV*.
D. EBV-ERER CISH положителни сигнали в клетъчното ядро на трофобластните плацентарни тъкани показват умерен интензитет.
E. *CMV* -ДНК оцветяване CISH на трофобластни плацентарни тъкани в клетъчното ядро със слаб интензитет.
F. Негативно CISH оцветяване за *EBV*

Принципно публикуваните данни за 22,5% плацентарна инфекция с *EBV* в проучването на Ali Hattem Bayati е по-висока в сравнение с други подобни [227]. Като достоверно обяснение за наблюдаваните разлики е редно да се вземат предвид географските вариации в честотата на разпространение на *EBV*.

Резултатите на Xuan-Hong Tomai и сътрудници доказват способността на *EBV* да се предава от ендометриума на матката към плода, което води до следните наблюдавани аномалии: мъртво раждане, аборт, вродени дефекти в новороденото [228].

Позитивни находки на *EBV* ДНК се откриват в 40,6% от проби на асимптоматични фертилни и стерилни мъже [229-230]. Този висок процент демонстрира и потенциалната

честота на директна трансмисия на инфекцията към женски генитален тракт и обуславя препоръка за изследване на двойката за *EBV* статус преди реализиране на концепция.

1.2.3.5. Роля на Човешкият херпесен вирус 6 (*HHV-6*) за женско безплодие.

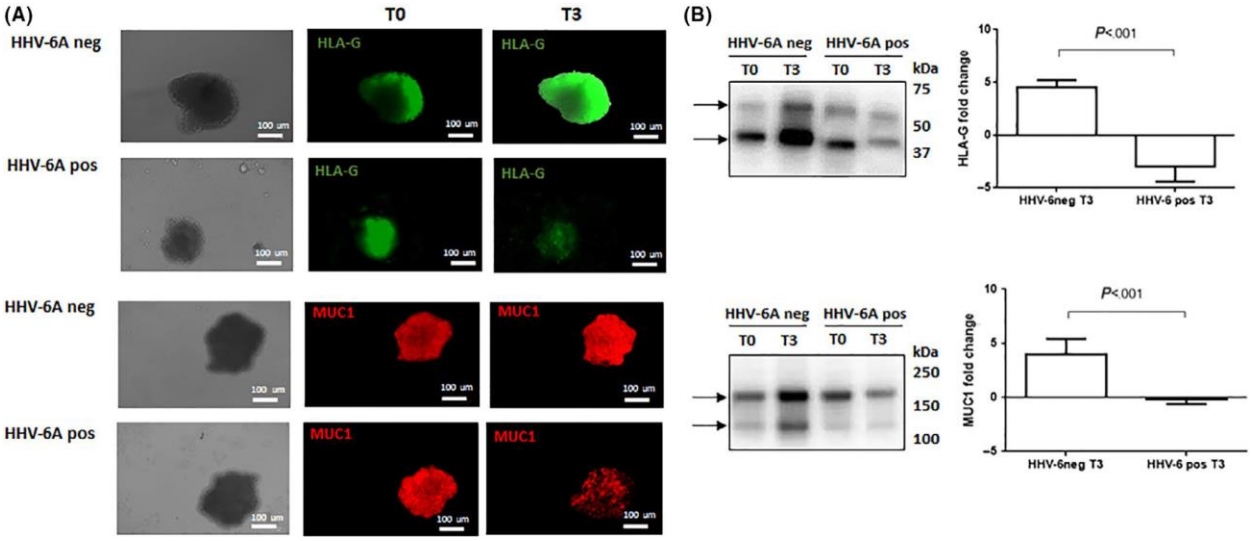
Човешкият херпесен вирус *HHV-6* е открит за първи път през 1986 г. и се характеризира с повсеместно разпространение. Идентифициран е, като етиологичен причинител на *roseola infantum* и е замесен в различна степен в редица патологии, като: чернодробно заболяване, пневмония, миокардит, множествена склероза, медикаментозно индуциран синдром на свръхчувствителност, нодуларна склероза /подгрупа на лимфома на Ходжкин/, автоимунни заболявания [232-233]. Сравнително скоро след откриването на *HHV*-6 е признато съществуването на вирусни варианти (*HHV-6A* и *HHV-6B*) и понастоящем се считат за отделни видове вируси на база специфични биологични, имунологични, патологични и молекулярни характеристики [234]. Въпреки, че и двата варианта на *HHV-6* заразяват главно Т-клетките, данните сочат, че *HHV-6* може също да зарази и да се реплицира в тъканите на човешки генитален тракт [235]. ДНК от *HHV-6* е детектирана в секрети от гениталния тракт на бременни и небременни жени [236].

Няколко проучвания съобщават за наличие на *HHV-6* в женски генитален тракт при ~25% от жените, като бременните се характеризират с най-високото/ преобладаващо разпространение на вируса. ДНК последователности на *HHV-6* и антигени се детектират и в биопсии от архивирани цервикални проби [237]. Тези данни подсказват възможността женския генитален тракт да бъде вероятно вторично място за *HHV-6* латентна инфекция и/или дълга вирусна персистенция. Възможната патогенна значимост на *HHV-6* за гениталния тракт и репродуктивните функции заслужава внимателна оценка.

Daria Bortolotti и сътрудници провеждат възлово изследване и първи докладват наличието на *HHV-6* в 40 % от ендометриалните клетки на жени с идиопатично безплодие и пълната му липса в контролната група. Екипът изследва задълбочено ефекта на *HHV-6A* инфекцията върху имунологичното състояние и реактивност на ендометриума. Доказват, че инфекцията с *HHV-6A* на човешки ендометриални стромални клетки (ESC) нарушава децидуализацията и променя ендометриалната молекулярна експресия [238]. Чрез “in vitro” модел демонстрират, че *HHV-6A* поттиска и отслабва децидуализацията на ендометриалните епителни клетки. Също така вирусът предизвиква намалена експресия на протеиновите нива на широко използвания маркер за децидуализация *HLA-G23* и *MUC1*. *HLA-G* представлява ключов фактор в процеса на децидуализация, като се смята, че участва също в диференциацията на ендотелните клетки, имплантацията, ангиогенезата, клетъчния растеж на трофобласти и имунна регулация по време на ранна бременност. Експресията на *MUC1* в ендометриума е най-висока през секреторните фази, когато настъпва ембрионалната имплантация и също така предпазва повърхността на лигавицата от инфекция и действието на разграждащи ензими [239]. Констатираното наблюдение е от

изключителна важност, тъй като редуцирането на ендометриалните *HLA-G* и *MUC1* нива категорично се свързва с рекурентни спонтанни аборти [238, 240].

В ключовото изследване се доказва как *HHV-6A* инфекцията променя профила на секреция на цитокини, с влияние върху ендометриалната имунна реактивност. За разлика от *HHV-6A* негативни безплодни жени, позитивните за *HHV-6A* безплодни жени се характеризират със свръх-активен имунен профил със завишена *IL-15/Fn-14* и *IL-18/TWEK* mRNA експресия. Наблюдават се също така повишени нива на NK и редукция на фракциите регулаторни Т- клетки в позитивни за *HHV-6A* безплодни жени. Имунната активност, наблюдавана при *HHV-6A* инфектирани пациентки, има отношение към неуспешна ембрионалната имплантация. Данните от изследването са сигнификантни тъй като докладват различен имунен клетъчен профил при стерилни жени в сравнение с жени без репродуктивни проблеми, включително завишени нива на маточните NK клетки и занижени Treg клетки. Проучването предлага нов механизъм, чрез който *HHV-6A* инфекцията води до дефектна децидуализация на ендометриума, респективно изроден имунен отговор, който може да повлияе на трофобластна миграция и набиране на имунни клетки (Фиг.12.).



[Daria Bortolotti et al. 2019]

Фиг. 12. Експресионни нива на *HLA-G/ MUC1* и най-функционалните им изоформи *HLA-G (39 kDa)* или *MUC1 (120 kDa)* в *HHV-6* позитивни и негативни съвместни култури на ендометриални епителни клетки и трофобластен свероид.

- Въздействие върху молекулярната експресия на на *HLA-G/ MUC1* в трофобласта: намалена експресия засечена спрямо Т0 до Т3 в *HHV-6* позитивни култури.
- Сигнификантна разлика в нивата на *HLA-G/ MUC1* и изоформите им в Т3 между *HHV-6* позитивни и негативни култури, детектирана чрез имунофлуоресценция и последващ дензитометричен анализ.

1.2.3.6. Роля на Човешкия херпесен вирус 7 (*HHV-7)* за женско безплодие.

Човешкия херпесен вирус *HHV-7* е открит през 1990г. и е член на бета херпесните вируси, тясно свързан с *HHV-6* и *CMV* [241]. *HHV-7* наскоро беше признат за алтернативен

причинител на *exanthem subitum*. Почти 100% от населението е заразено с *HHV-7* по време на ранна детска възраст и доказано остава в доживотно латентно състояние.

Наличие на *HHV-7* е установено в 21,4% в периферна кръв на безплодни жени под формата на виремия, настъпила в резултат на реактивация. Впоследствие пациентите са лекувани с валацикловир. Като критерий за селекция били стойностите на NK да са равни или по-високи от 175 cells/μL. Разбира се завишеният профил на NK фракцията е интерпретиран, като асоцииран със субклинична виремия на членове от *HHV* и след проведеното лечение NK нивата значително намаляват, като достигат до средни или нормални нерискови нива [242]. В друго проучване данните показват, че *HHV-7* и *HHV-6* се детектират в цервикса на инфектирани жени в късна бременност и могат да причинят перинатална инфекция, като установената честота на *HHV-7* е само 2,7%, докато за HHV-6 е 19,4 % [243].

Няма данни за участието му в мъжкия фактор на безплодие. Данните за ролята на *HHV-7* в женското и мъжко безплодие са оскъдни и епизодични. Нужни са разширени бъдещи проучвания за да се приеме/отхвърли или изясни подобна връзка.

1.2.3.7. Роля на Човешкия Варицела-зостер вирус (*VZV*) за женско безплодие.

Човешкия херпесен вирус 3 *HHV-3* или ***VZV*** причинява варицела и херпес зостер. Неонаталната варицела има текуща смъртност от 7%. Варицелата по време на бременност може да бъде избегната чрез ваксиниране на жени, които нямат естествен имунитет или не са били ваксинирани в детска възраст. Като част от стратегия за превенция, избягване или намаляване на случаите на заболяване се препоръчва скрининг за имунитет преди бременност, ако е възможно, или през ранна бременност [244].

Първична *VZV* инфекция на майката през първите 2 триместъра причинява вътрематочна инфекция в приблизително 25% от случаите, а вродените аномалии се срещат при ~ 12% от заразените фетуси. С напредване на бременността се увеличава рискът от предаване към плода. Интраутеринното ограничаване на растежа се среща при ~ 23% от бременностите, усложнени от варицела, а ниско тегло при раждане се среща при почти всички засегнати бебета. Най-високите нива на смъртност и заболеваемост се наблюдават при наличие на вроден синдром на варицела (CVS), варицела-асоциирана пневмония на майката и неонатална варицела. Честотата на смъртност от варицела-асоциирана пневмония при майката е 3-14%.

Важността на *VZV* инфекцията за репродуктивното благополучие, изнася този патоген като основен за изследване при планиране на бременност. Връзката първична *VZV* инфекция и патологична бременност, асоцииращa се със спонтанен аборт или раждане на дете с аномалии, подсказва евентуална роля на *VZV* и в случаи на компроментирана концепция. Към днешна дата липсват асоциативни данни за ролята на рекурентна латентна *VZV* инфекция при безплодни жени [242, 245].

1.2.3.8. Роля на Човешкия херпесен вирус 8 (*HHV-8)* за женско безплодие.

Човешкия херпесен вирус 8 ***HHV-8*** е свързан със сарком на Капоши, първичен ефузионен лимфом и плазмен клетъчен вариант на болестта на Касълман. *HHV-8* има необичайно географско разпространение, като преобладава в африканските и средиземноморските страни и сред ашкеназките евреи, арабите и някои американски индиански популации [246]. В райони, където случаите на сарком на Капоши са спорадични, *HHV-8* инфекцията се придобива в зряла възраст и се свързва главно със сексуална активност и ориентация. В райони на ендемичност и субендемичност обаче разпространението на вируса е често срещано в детска възраст.

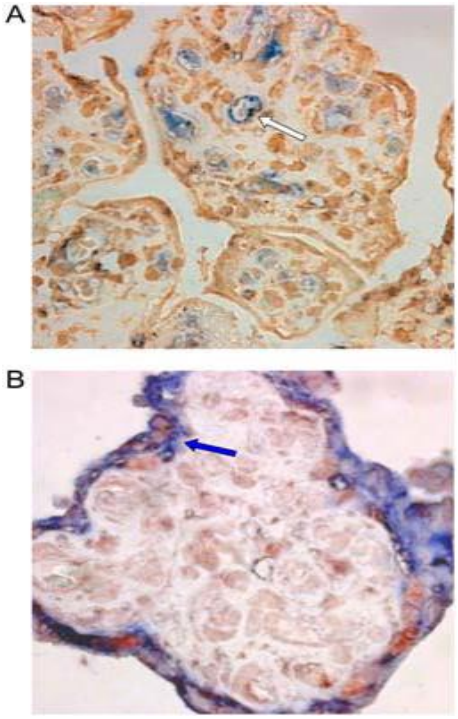
Описани са редки случаи на сарком на Капоши при новородени при които се детектира ДНК на *HHV-8* в мононуклеарните клетки на периферната кръв, като са засегнати ендемични за заболяването региони. Тези открития показват, че вътрематочна инфекция с вируса може, макар и рядко, да настъпи в географски региони, където *HHV-8* е с ендемично разпространение. Andrea Lisco и екип доказват, че бременността може да инициира репликация на *HHV-8* в имунокомпроментирани жени, инфектирани с *HIV-1*. Увеличеният вирусен товар повишава честотата на предаване от майка на новородено. При новородените са регистрирани висока степен на виремия с *HHV-8,* което е показателно за перинатална трансмисия [247].

Логично степента на откриване на *HHV-8* в цервико-вагинални секрети също е по-висока сред африкански жени, отколкото сред жени от неендемични или субендемични региони. Вирусното натоварване на женския генитален тракт с *HHV-8* може да повлияе и увеличи риска от вертикална трансмсия [248]. Вертикалното предаване буди интерес поради възможна реактивация на херпесните инфекции по време на бременност, поради имунообусловен преход от латентна към активна вирусна фаза, което носи потенциален риск от развитие на фетални увреждания, свързани с *HHV-8*.

Въпреки че има връзка между инфекцията с *HHV-8* и случаи на спонтанен аборт, ниско тегло при раждане и вътреутробно перинатално предаване на вируса са нужни преки доказателства за точните механизми.

Съществен принос за оценка на „in vitro“ и „in vivo“ чувствителността на плацентарните клетки към *HHV-8* инфекция имат Di Stefano и екип [249]. Провеждат анализи за качествено и количествено определяне на краткосрочни инфекции с *HHV-8* върху плацентарни хорионни въси, изолирани от терминална плацента чрез PCR и RealTime PCR в *HHV-8* серопозитивни пациентки. „In vitro“ инфектираните хистокултури показват увеличаващи се количества на ДНК от *HHV-8* в цито- и синцитиотрофобласти, свързано с литични процеси (Фиг. 13.). Повишени апоптотични събития са визуализирани също в „in vivo“ плацентарните хистокултури. Направените от екипа констатации показват недвусмислено, че *HHV-8,* подобно на други човешки херпесни вируси може да инфектира клетките на плацентата „in vitro“ и „in vivo“. Di Stefano и сътрудници осигуряват

доказателства, че това явление може да повлияе на изхода на бременността при жени, заразени с *HHV-8.*



[Di Stefano M et al. 2008]

Фиг. 13. Двойно имунохистохимично оцветяването с моноклонални антитела срещу цитокератин 7 /маркер за цито- и синцитиотрофобласти/ и CD31 /маркер за ендотелни клетки/ в комбинация с анти-LANA антитяло.

- Ендотелни (A) и синцитотрофобластни клетки (B) експресират LANA антигена, като по този начин се потвърждава, че и двата типа клетки са пермисивни за *HHV-8* инфекция.
- LANA вирусен антиген: кафяво оцветяване и Алкална фосфатаза за CD31 в ендотелни (A) и синцитоторфобластни клетки (B): синьо оцветяване

1.2.3.9. Допълнителни данни за сем. *Herperviridae* и връзката им с репродукцията.

Интересни данни за двойки с продължителен неизяснен стерилитет и успешна бременност след лечение с антивирусен препарат Acyclovir докладват Kundsin и сътрудници [250]. Подобен успех отчитат Borai и екип при двойка с 12 изкуствени инсеминации и 5 неуспешни *in vitro* ембрионални трансфера, при която след двуседмично лечение с Acyclovir при двамата партньори резултатът е близначна бременност [203]. Докладват и случай на двойка, която прави неуспешни опити за *in vitro* оплождане 10 години и след антивирусно лечение, се регистрира безпроблемна бременност по естествен път. Thomas и сътрудници [242], изследват периферна кръв от инфертилни жени и отчитат при 64.3% позитивен статус за различни вируси от херпесното семейство (*HSV-1, HSV -2, CMV, HHV-6, HHV -7, VZV* и *HHV-8*). Оказва се, че асимптоматичната субклинична виремия с таргетните за проучването вируси при жени с репродуктивни проблеми, съвсем не е рядкост.

Доказана е недвусмислена корелация между повишената концентрация на NK клетките в периферната кръв при жени с история на повтарящи се аборти, както и с наличие на *HHVs* субклинична виремия [251-252]. Повишената концентрация на NK клетките в периферна кръв, нарушен Th1/Th2 баланс, повишената цитотоксичност и редуцираните нива на Tregs задвижват каскада за имунулогично отхвърляне на ембриона и често са причина за повтарящи се миседи. Прилагането на терапии с Acyclovir, Vancyclovir и други антивирусни препарати води до понижаване и нормализиране на NK клетките в периферна кръв.

Проучването върху ролята на бактериални (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis*) и вирусни (*HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6/HHV-7, HHV-8*) патогени, като възможна причина за репродуктивна несполука при жени е ключово за изясняване на инфекциозна етиология за безплодие. Потенциалната инфекциозна причина на дълговременен проблем с безплодие не бива да се подценява поради сериозните психични и физиологични обструкции и усложнения, които може да предизвика и характерната безсимптомна персистенция. Ролята на таргетните патогени в настоящия дисертационен труд в отключване на каскада за имунологично отхвърляне, рекурентни ранни и/или късни аборти, редица гинекологични патологии, както и фетални увреждания, сочи нуждата от обстойна инфекциозна диагностика преди/или при настъпване на концепция. Сравнително лесната терапевтична податливост и избор на адекватно лечение на бактериалните и вирусни фактори би спомогнала за овладяването и елиминирането им, като проблемен аспект на репродукцията чрез приложение на адекватен, навременен скрининг.

Използването на биологична проба- менструална тъкан, покриваща функционалния ендометриум, директна бактериална/вирусна активност, както и имплантационния периметър на бъдещия ембрион ще допринесе за установяване на неинвазивен модел за диагностика на ендометриални инфекции. По този начин се покрива щадящо и горен женски генитален тракт, където ~ 30% от инфекциите принципно остават недиагностицирани чрез рутинната цервико-вагинална диагностика.

Диагностиката на инфекциозното възпаление на ендометриума е от голяма полза за адекватно лечение на продължителното безплодие при страдащите двойки. Този подход безспорно увеличава шансовете за успешно зачеване. Оптималният избор на Real-Time PCR молекулярно-биологичен метод за диагностика ни подсигурява възможно най-висока чувствителност, специфичност и прецизност при детекцията на таргетния панел бактериални и вирусни микроорганизми.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Проучване ролята на бактериални и вирусни патогени (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) при жени с репродуктивни несполуки и внедряване на неинвазивен диагностичен модел за детекцията им в горен генитален тракт върху биологичен материал - менструална тъкан.

2.2. ЗАДАЧИ

2.2.1. Подбор на клинични групи и изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването, съдържащи подробна медицинска информация, асоциирана с безплодие.

2.2.2. Оптимизиране на молекулярно-биологична методика за изолиране на тотална ДНК от биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия.

2.2.3. Въвеждане на молекулярно-биологична методика за амплификация на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген.

2.2.4. Определяне обща честота на инфекция с таргетниия вирусно-бактериален панел в клиничните групи.

2.2.5. Определяне на клинико-патологичен статус и видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) в менструална тъкан от инфертилни жени /клинична инфертилна група/.

2.2.6. Определяне на видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролна инфертилна група/.

2.2.7. Определяне статус на ендометриален микробиом в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролна инфертилна група/.

2.2.8. Сравнителен анализ на данните от клинична и контролна инфертилна група относно приложението на таргетния вирусно-бактериален панел върху биологичен материал менструална тъкан и ендометриална биопсия.

2.2.9. Обобщение и интерпретация на клиничните и молекулно-инфектологични резултати от настоящата разработка.

2.2.10. Създаване на биобанка с изолирани матрици тотална ДНК от менструална тъкан и ендометриална биопсия на жени с репродуктивни несполуки от български произход.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. Биологичен материал

В настоящата дисертация анализите бяха извършени върху два вида биологичен матерал: менструална тъкан и ендометриална биопсия. Биологичният материал послужи, като селективен критерий за обособяване на клиничните групи.

Молекулярно-инфектологичните изследвания бяха проведени върху следните клинични групи:

Инфертилна група - 180 пациентки с анамнеза на безплодие, включваща: спонтанен аборт или рекурентни спонтанни аборти, трудности в естественото зачеване, физиологична обструкция на конкретни анатомични отдели от женския генитален тракт, вследствие на възпаление или хирургични интервенции, неуспешни процедури за асистирана репродукция, наличие на автоимунно заболяване или други придружаващи заболявания. Анализите са проведени върху биологична проба: менструална тъкан.

Инфертилна контролна група - 65 пациентки с анамнеза на безплодие, включваща единствено история на спонтанен аборт или рекурентни спонтанни аборти и липса на здравословните проблеми, свързани с репродуктивна несполука, описани в предходната група.
Анализите са проведени върху биологична проба: ендометриална биопсия, като целта е да се направи съпоставка на неинвазивната менструалната тъкан с инвазивната биопсия

Здрава контролна група - 90 здрави фертилни пациентки.
Анализите са проведени върху биологична проба: менструална тъкан.

Пробандите от всички групи са с отрицателен цервико-вагинален инфекциозен статус по отношение на таргетния диагностичен панел. Анализите са проведени върху цервико-вагинални секрети.

Всички безплодни и фертилни жени, включени в проучването са на възраст 22-49 години с български произход.

Пробандите са клинично диагностицирани със стерилитет по установените стандарти и насочени за ДНК анализ от медицински колаборатори акушер-гинеколози и специалисти по асистирана репродукция. Преобладаващата част от пациентките са насочени от клиника O.S.C.A.R.; Медицински център "Д-р Сигридов" и ГМДЛ „Геника“.
Пациентките са насочени с цел установяване наличие/липса на таргетните за проучването бактериални (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/parvum, Mycomplasma*

hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis) и вирусни (*HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) патогени, като в групата с ендометриални биопсии са проведени и допълнителни изследвания за оценка на ендометриален микробиом.
От всички пациентки е получено писмено информирано съгласие за молекулно-инфектологичен анализ преди провеждане на проучването.
Настоящото изследване е финансирано частично по договор :№209С/2018 на Медицински Университет София, България.

Получените молекулярно-генетични данни за пробандите са интерпретирани в комбинация с предклинични и клинични данни, предоставени от медицинските ни колаборатори (на база унифицирана анкетна карта) в търсене на значими корелации и формиране на възможно най-смислени комплексни изводи по проблема.

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Снемане на подробна анамнеза за репродуктивна несполука при изследваните групи инфертилни български жени.

За снемането на подробна анамнеза относно характера на репродуктивна несполука при инфертилните български жени с цел класифициране към конкретна клинична група използвахме специално изготвена анкетна карта. Чрез анкетната карта успяхме да получим ценна съпътстваща информация под формата на предклинични, клинични и ретроспективни медицински данни, като период на безплодие, наличие на спонтанни аборти (брой/гестационна седмица), наличие/липса на автоимунни заболявания, неуспешни “in vitro” опити за оплождане, данни за имунен и хормонален статус и др.

Анкетните карти са създадени с цел максимално унифициране на съпътстващата информация, използвана за детайлна характеристика на вида репродуктивна несполука при пробандите (виж Образец 1.). В образеца на анкетната карта, поместен в дисертацията са отразени базовите въпроси за събиране на интересуващата ни информация. Като резултат от конструктивното ни сътрудничеството с медицинските колаборатори успяхме да включим в пациентските досиета и допълнителни детайли.

<u>Образец 1.</u> Анкетна карта за снемане на съпътстваща информация, относно характера на репродуктивните проблеми и общ здравен статус на инфертилни български пациентки.

1. Общ статус – среден период на безплодие
2. Причина за безплодие
   - трудности при забременяване
   - повтарящи се спонтанни аборти
   - други:
3. Хормонален статус - репродуктивни хормони, тиреоидни хормони

4. Вид професия
   - излагане на химични агенти
   - излагане на тежки метали
   - излагане на радиационно лъчение
   - излагане на агресивна околна среда
   - други:

5. Местоживеене:
6. История на възпаление на уро-генитален тракт:
6А. Провеждано ли е лечение и какво:
7. Придружаващи болести
8. Стил на живот: (тютюнопушене, диета, спорт, полов живот)
9. История на автоимунни заболявания при пациентката или партньора
   - Грейвс синдром (Базедова болест, хипертиреоидизъм)
   - Хашимото
   - Системен лупус еритематозус
   - Антифосфолипиден синдром
   - Синдром на Рейно
   - Псориазис (псориатичен артрит)
   - Синдром на Сьорген (със засягане на слъзни и слюнчени жлези)
   - Ревматоиден артрит

10. Налични ли са резултати от проведен хромозомен анализ (кариограма) или генетични анализи имащи отношение към репродуктивна несполука?
10А. Моля споделете резултатите от проведените генетични изследвания.

3.2.2. Колектиране и преданалитична обработка на биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия.

<u>Менструална тъкан:</u>

Важно изискване за отделянето на менструална тъкан е пробата да бъде отделена пасивно в най-обилния ден от менструацията в зависимост от индивидуалните физиологични особености на всяка пациентка. Необходимо е отделената проба да не е оскъдна и да съдържа тъкан по възможност. За целта е допустимо неколкократно колектиране на материал в рамките на 24 часа. Целта е биологичната проба менструална тъкан да бъде репрезентативна за горен генитален тракт, съдържайки ендометриални децидуални клетки.

Менструалната тъкан се отделя при стриктно спазване на инструкциите и се колектира в контейнер, съдържащ 2мл. 0,5 М ЕДТА с pH=8,0. Разтворът на ЕДТА се използва, като транспортна среда, както и в качеството си на стабилизатор, който не позволява слепване и коагулация на отделените клетки/тъкани. Разтворът на 0,5 М ЕДТА с

pH=8,0 има протективна функция за запазване интегритета на молекулите за последващи анализи по време на транспортирането до лабораторията.

Ако не е възможно да бъде обработена своевременно, менструалната тъкан подлежи на замразяване на - 20 ºС. Размразяването на дълбоко замразени менструални тъкани се извършва постепенно. Първоначално пробите престояват в хладилник от 2-8 ºС /4-6ч., след което на стайна температура 18-25 ºС /2ч. и накрая в термостат на 37 ºС /1ч. По този начин в ендометриалните клетки, обект на последващи анализи настъпват най-малко морфологични и деструктивни промени, вследствие от криопроцедурите и размразяването е максимално доближено до физиологични органични условия.

Към менструалната тъкан с консервант 0,5 М ЕДТА се добавя 40 µl протеиназа К (10mg/ml). Хомогенизира се и се инкубира на 65 ºС за 8-12 часа. Менструалната тъкан се центрофугира на 8000 rpm. за 15 мин. на стайна температура 18-25 ºС. Супернатантата се отстранява внимателно, без разрушаване на утайката /пелената от клетки/.

Ендометриална биопсия:

Ендометриалните биопсии в проучването са добити чрез ендометриален смукателен катетър в съответствие с установените стандарти в добрата гинекологична практика. Биопсията на ендометриума на практика засмуква/отделя малка част от най-вътрешната част на маточната лигавица. Специалният катетър използван за манипулацията представлява малка гъвкава пластмасова тръба с диаметър ~3 mm. В сравнение с традиционната аспирационна биопсия, която се извършва с помощта на специална спринцовка или вакуум инструмент, тръбната процедура е по-малко инвазивна, по-нежна. Не изисква анестезия и отнема 7-10 минути.

В качеството си на консервант и транспортна среда за отделената ендометриална биопсия отново се използва 1мл. 0,5 М ЕДТА, като се спазват абсолютно идентични стъпки за замразяване и размразяване на ендометриалната биопсия, каквито се прилагат спрямо менструалната тъкан /виж раздел „Менструална тъкан“/.

Към ендометриалната биопсична тъкан с консервант 0,5 М ЕДТА се добавя 15 µl протеиназа К (10mg/ml). Хомогенизира се и се инкубира на 65 ºС за 12 часа. Разградената тъкан се центрофугира на 8000 rpm. за 15 мин. на стайна температура 18-25 ºС. Супернатантата се отстранява внимателно, без разрушаване на утайката /пелената от клетки/.

3.2.3. Изолиране на тотална ДНК от предобработена менструална тъкан/ ендометриална биопсия.

За изолиране на високомолекулна тотална ДНК /геномна и екзогенна/ от обработената менструална тъкан/ ендометриална биопсия беше използван комерсиален кит на AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic. Като изходно количество клетъчен материал се използва 120 µl от утаените след центрофугиране клетки. Бяха спазени стриктно

инструкциите към методичния протокол на производителя. Бяха въведени 2 модификации към оригиналния алгоритъм за изолиране на тотална ДНК с комерсиален кит с цел постигане на възможно най-оптимален добив на висококачествена, пречистена геномна (човешка) и екзогенна (бактериална/вирусна) ДНК:

1). Беше използван 15mg/µl Glycogen (Ambion, Life Technologies, USA), като носител на ДНК-матрицата, който се добавя на етап прибавяне на сорбент в стандартната процедура към вече лизираните ендометриални клетки.

2). Бяха въведени 2 допълнителни стъпки на промиване след приключване на стандартните процедури с миещите разтвори към кита. Допълнителните стъпки са прибавяне на 250µl 75% EtOH и последващо центрофугиране за 30 секунди/10 000 об. двукратно.

С цел оценка на добивните параметри на прицелната търговска екстракция в експерименталния етап беше проведена и екстракция с фенол-хлороформ по следния протокол:

Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:

Изходните клетки се поставят в епруветка тип Eppendorf от 1,5 ml и към тях се добавят 500 µl SE-буфер, 25µl 10% натриев додецил сулфат (SDS) и 25µl протеиназа К (10 mg/ml). Разбърква се леко и се инкубира на 55 ºС за 3-4 часа.

Преципитация на белтъците:

След протеолизата в епруветката се добавят 300µl фенол (pH=8,0) и 300µl хлороформ/изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Извършва се интензивно вортексиране и се центрофугира 15 min на 12 000 rpm.

Преципитация на ДНК:

Горната фаза се прехвърля в нова Eppendorf-епруветка чрез внимателно отпипетиране без да се увлече интерфазата. Добавя се 1/10 от обема 3 М натриев ацетат (CH3COONa) и внимателно се размесва. Добавят се 2 обема ледено студен абсолютен етанол и се инкубира 30 min на -70 ºС. Центрофугира се 15 min на 13000 rpm. Надутаечната течност се отлива внимателно. Утайката се промива с 0,5 ml 70% етанол, след което се центрофугира 10 min на 13000 rpm. Надутаечната течност се отлива и утайката се суши на въздух. Утайката се разтваря в ТЕ буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

SE буфер (pH=8,0): NaCl – 75 mM; Na2EDTA – 25 mM

TE буфер (pH=7,4): TRIS/HCl (pH=7,4) – 10 mM; EDTA (pH=8,0) – 1 mM

3.2.4. Полимеразна верижна реакция (PCR - Polymerase Chain Reaction)

В настоящето проучване методът беше приложен за анализ и интерпретция на резултатите относно *Chlamydia trachomatis* и housekeeping гена *CD*.

Методът полимеразна верижна реакция, е разработен от Kary Mullis през 1985г., който чрез използването на две срещуположно ориентирани, олигонуклеотидни секвенции и ензима ДНК полимераза, успява да намножи фрагмент от ДНК, използван като матрица. Многократното повтаряне на тази реакция, води до експоненциалното нарастване на количеството на продукта. Широкото приложение на тази техника става възможно благодарение на използването на термостабилна ДНК-полимераза и апарат, които позволяват автоматизирането на процеса.

Самата реакция се състои от последователно повтарящи се цикли, всеки един от които съдържа три етапа, протичащи при различна температура :

Термична денатурация на двойноверижната ДНК

Процесът започва с начална денатурация при 95^0C за време от 3 до 5 мин. и цели пълното разделяне на двуверижната ДНК-матрица до едноверижна. Геномната ДНК не може да ренатурира напълно през другите етапи на реакцията, и затова денатурацията на всеки следващ цикъл е по-кратка - около 30 секунди.

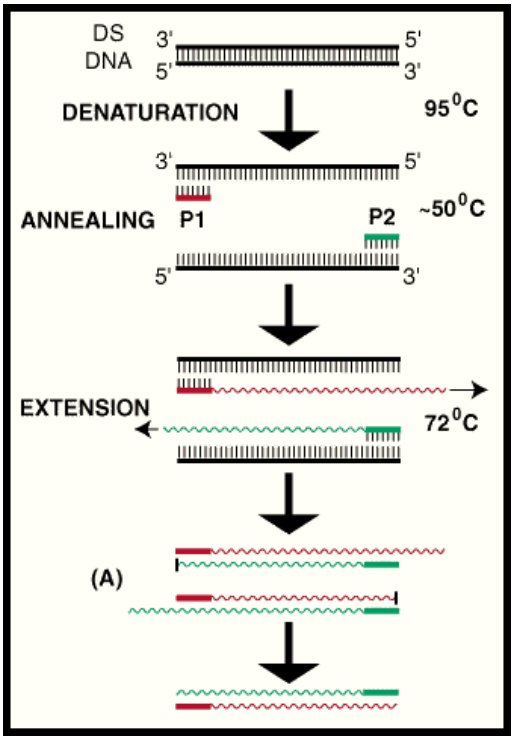
Хибридизация на зародишите (праймерите) върху комплементарните им участъци.

Оптимизацията на температурата, при която праймерите хибридизират високоспецифично е един от ключовите моменти на полимеразната верижна реакция. В първите цикли, когато преобладава основно геномната ДНК, като матрица, праймерите трябва да направят нещо, като „геномен скрининг" за да открият комплементарните им последователности. За целта те трябва да имат достатъчно време, както и достатъчно едноверижна матрица за да могат да хибридизират ефективно. Темпертурата на това взаимодействие е строго специфична и се определя от базовия състав и дължината на използваните праймерни последователности.

Синтез на комплементарна верига – удължаване (extension)

Той протича при 72^0C, като при тази температура термостабилните търговски варианти ДНК- полимерази, имат най-голяма полимеразна активност. Ензимът се свързва с 3'-хидроксилната група на хибридизиралият за матрицата зародиш. За фрагменти под 500 нуклеотида, са достатъчни 20 секунди за синтез, а за фрагменти с големина до 1200 нуклеотида, около 40 секунди. Синтезът при последния цикъл, е по-дълъг от 7 до 15 минути, с цел да се осигури цялостното доизграждане на някои частични фрагменти. Новата ДНК-верига , комплементарна на матричната, е синтезирана в посока 5'→3'. Броят на циклите в една полимеразна верижна реакция, обикновено е от 25 до 35-40.

Схематично представяне на полимеразно верижната реакция е представено на (Фиг. 14.).



Фиг. 14. Схематично представяне на полимеразна верижна реакция.

За осъществяване на полимеразната верижна реакция са необходими следните компоненти:

- ДНК – едноверижна матрица
- Зародиши (праймери) - къси олигонуклеотиди, комплементарни на краищата на дефинирания участък върху ДНК матрицата. От тях започва синтезата на ДНК при всеки нов цикъл на PCR – реакцията. Техният подбор и дизайн е от решаващо значение за качеството на процеса, като дължината им може да варира от 14 до над 40 бази със съдържание на G + C бази от 40 до 75 %.
- Дезоксинуклеотидтрифосфати – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно съгласно правилото за комплементарност. Задължително условие е четирите типа дНТФ да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес. Оптималната концентрация за всеки нуклеотид от 20 до 200 μM.
- Реакционен буфер - съдържа магнезиеви йони, моновалентни катйони и някои фактори, стабилизиращи ензима и влияещи върху неговата активност. Също осигурява подходящото pH=8,3 – 9,0 на средата. В състава си включва 10-50 mM Tris-HCl, pH=8.3-9.0; до 50mM KCl и 0,5-5,0 mM $MgCl_2$. Освен това, може да включва и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти, като диметил сулфооксид (DMSO) и други. Компонентите на буфера могат да варират по качество и количество, в зависимост от използваната Taq – полимераза.
- Термостабилна ДНК полимераза (Taq DNA polymerase). Тя е изолирана от микроорганизма *Termophylus aquaticus*. Ензимът Taq полимераза е

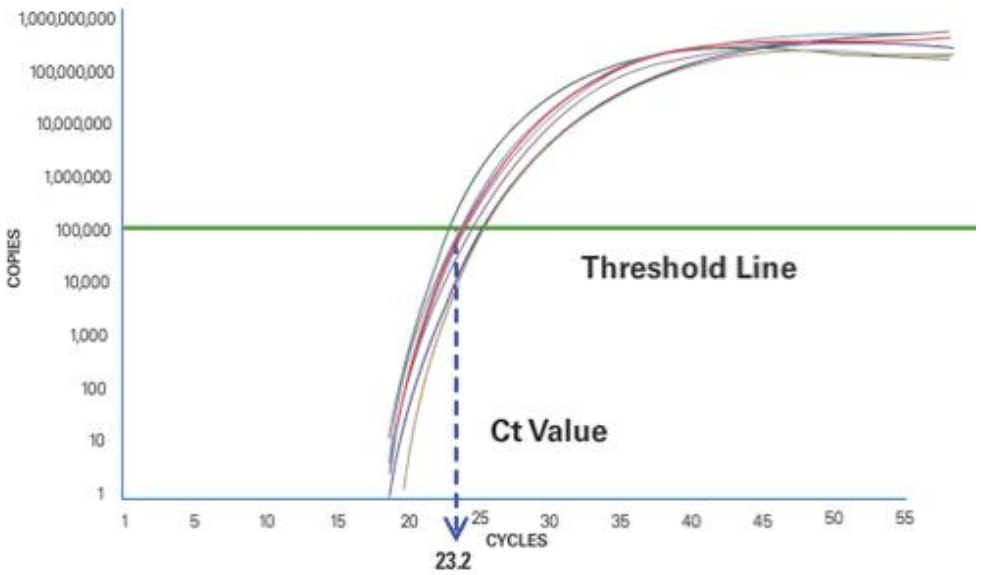
термостабилен и запазва активността си 45 до 60 мин. при 94˚C – т.е. през целия амплификационен процес. Оптималната температура за синтез е 72˚C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е от 1 до 5 U.

3.2.5. Real time PCR - метод за количествен анализ.

Real time PCR метода беше приложен в настоящата разработка за анализ на всички таргетни бактериални и вирусни патогени с изключение на *Chlamydia trachomatis.*

Базира се на детекцията и количественото определяне на флуоресцентното багрило (секвенциално специфично или неспецифично) във всеки един отделен цикъл на PCR реакцията. Не е необходим гел за анализ, което има своите предимства, свързани с избягването на: занижена прецизност, ниска чувствителност, ниска разделителна способност, невъзможност за изразяване на резултатите в числови стойности и др. Метода позволява непрекъснато наблюдение на акумулираните продукти от PCR по време на амплификацията, като измерва флуоресциращото излъчване, като индикатор за амплифицираните продукти за всеки един цикъл PCR в реално време.

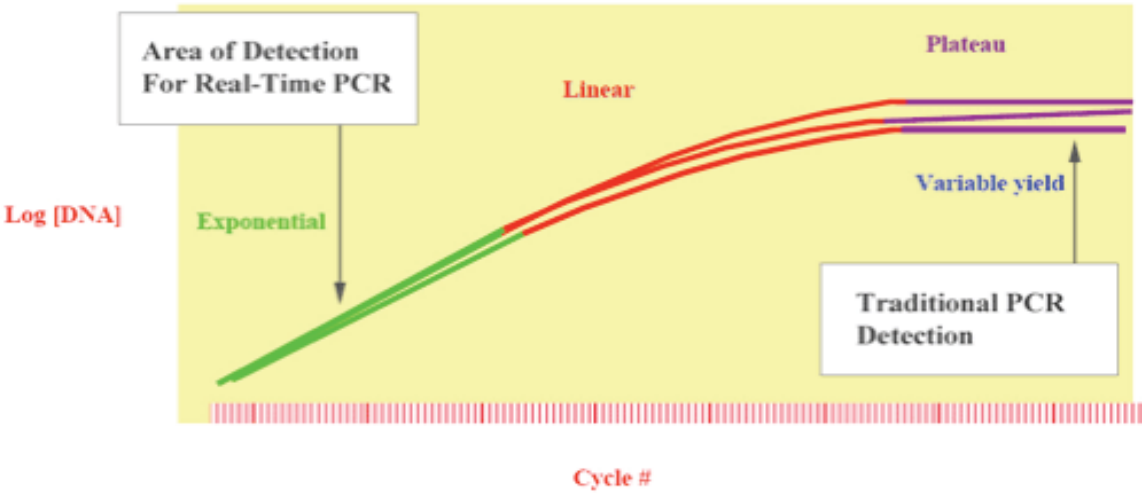
Първото значително повишение на количеството на продукта от PCR реакцията (Ct–прагов цикъл) корелира с началното количество ДНК (Фиг.15.).



Фиг. 15. Ct –прагов цикъл на реакцията, равен на изходното количество матрица (ДНК, РНК), което позволява количествено определяне.

Двата метода (конвенционален PCR и Real time PCR) ни позволяват да отчетем резултатите в различен етап от амплификацията. Конвенционалният PCR метод ни дава възможност да видим продукта на последния цикъл – момента когато реакцията е достигнала плато. PCR в реално време ни позволява да видим как се увеличава броя на

копията на нашия таргетен продукт през цялото време на реакцията. По този начин можем да отчетем реалните разлики в началните количества на матрицата в различните проби. Нарастването на флуоресценцията с всеки изминал цикъл от експоненциалната фаза е правопропорционално на увеличението на броя копия на продукта (Фиг. 16.).



Фиг. 16. Фази на амплификационната реакция. Области на детекция на амплификатите при двата метода: real time PCR-експоненциална фаза; PCR-плато.

Съществуват два варианта на количествен анализ:

- абсолютен – измерва се точния брой копия от дадена нуклеотидна последователност;
- относителен – определя се колко пъти повече/по-малко е дадена последователност в сравнение с референтна такава.

Основни принципи на количествения PCR:

Техника на хидролизационни „probe" секвенции

Хидролизационните „probe" секвенции са свързани с флорохромен сигнален попивател, който абсорбира флуоресциращите сигнали от флорохрома на сигналния флорохром докато "probe" е свързан. Впоследствие при амплификация на определена секвенция хидролизационният „probe" се измества, след което се хидролизира от Taq полимеразата. Това води до разделяне на сигналния и попиващия флуорохром и вследствие на това флуоресциращия репортерен флуорохром се установява. По време на всеки следващ цикъл, този сигнал на флуоресциране се засилва поради прогресивното и експоненциално акумулиране на свободни сигнални флуорохроми.

Техника на хибридизационните "Hybprobes" секвенции

Това са олигонуклеотиди, комплементарни на участък между двата праймера. В 5' края му е разположен флуорофор, а в 3' края т. нар. гасител (quencher). Когато върху пробата попадне лазерен лъч, високо енергийния флуорофор поема фотона, но ниско енергийния гасител подтиска светенето му. В хода на амплификацията полимеразата започва да добавя

нуклеотиди към 3’ края на праймера, а когато наближи пробата я разгражда (5’>3’ екзонуклеазна активност). Разпадането на пробата раздалечава флуорофора от гасителя, в резултат на което той започва да свети. Съществуват две основни приложения на флуоресцентно белязаните TaqMan проби за PCR в реално време:

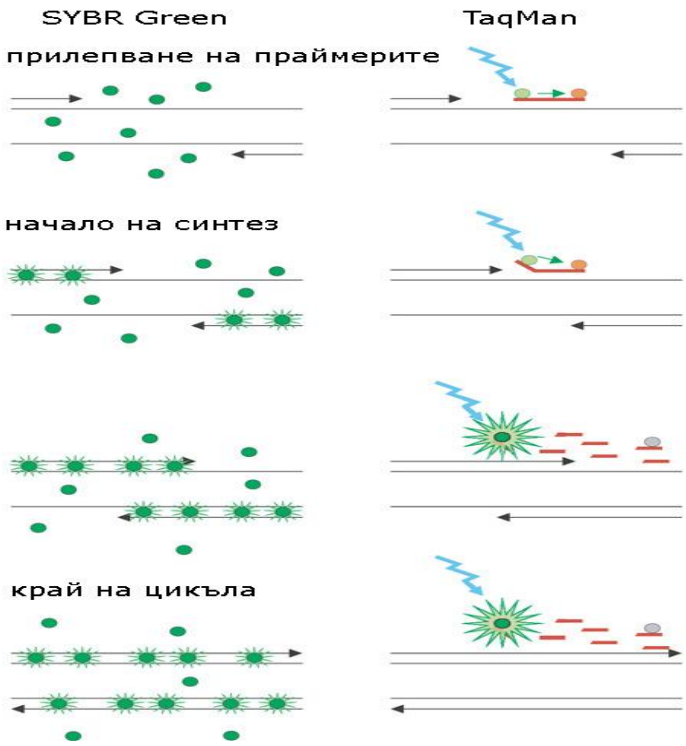
- количествен анализ – определяне на брой копия от дадена секвенция.
- алелна дискриминация – разграничаване на два (или повече) варианта на една и съща секвенция.

За нуждите на количественият анализ използваме факта, че TaqMan пробите ни позволяват да отчетем броя на новосинтезираните фрагменти през експоненциалната фаза на амплификацията. Когато трябва да различим алели, използваме проби, които са комплементарни на съответните варианти и са белязани с различни флуорофори.

Друга разновидност на Real time PCR - метода за количествен анализ представлява техниката на SYBR Green белязане.

Техника на SYBR Green белязане

Молекулите на SYBR Green багрилото интеркалират с ДНК и когато се закачат за малката бразда на двойно верижните спирали започват да флуоресцират. Предимства на SYBR Green детекцията е, че е универсален маркер, който не изисква специфични проби, икономически по-изгоден и чрез закачането на много флуорофорни молекули към продукта се постига по-висока чувствителност. Недостатък е, че ако се прилага за провеждане на алелна дискриминация се изисква сериозна допълнителна оптимизация. Също така съществува риск от фалшиво-положителен резултат, поради възможността на багрилото да бележи и неспецифични продукти (Фиг.17.).



Фиг. 17. Принцип на количествения PCR в реално време, фази. SYBRGreen и TaqMan белязане.

3.2.6. Дизайн на праймери за PCR амплификация на контролен *CD* housekeeping ген за човешка геномна ДНК.

За осъществяване на контрол за оценка на количеството и качеството на изходния биологичен материал (менструална тъкан; ендометриална биопсия), проведохме PCR за детекция на ДНК от човешки геном. Бяха използвани специфично дизайнирани праймери за прицелно намножаване на *CD* housekeeping гена. Използвахме нуклетидните секвенции от базите данни на NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ , както и програма за провеждане на виртуален PCR (PRIMER 3) http://simgene.com/Primer3 (Фиг. 18.).

>chr11:5226462-5227189 amplicon size: 728 bp
ATCACTTAGACCTCACCCTGTGGAGCCAcaccctagggttggccaat
ctactcccaggagcagggagggcaggagccagggctgggcataaaagtcagggcag
agccatctattgcttacatttgcttctgacacaactgtgttcactagcaacctcaaacagaca
ccatggtgcatctgactcctgaggagaagtctgccgttactgccctgtggggcaaggtgaa
cgtggatgaagttggtggtgaggccctgggcaggttggtatcaaggttacaagacaggttt
aaggagaccaatagaaactgggcatgtggagacagagaagactcttgggtttctgatag
gcactgactctctctgcctattggtctattttcccacccttaggctgctggtggtctacccttgga

cccagaggttctttgagtcctttggggatctgtccactcctgatgctgttatgggcaaccctaa
ggtgaaggctcatggcaagaaagtgctcggtgcctttagtgatggcctggctcacctggac
aacctcaagggcacctttgccacactgagtgagctgcactgtgacaagctgcacgtggat
cctgagaacttcagggtgagtctatgggacgcttgatgttttctttccccttctttttctatggttaa
gttcatgtcataggaaggggataagtaacagggtacag**TTTAGAATGGGAAAC**
AGACGAATGA

Фиг. 18. Нуклеотидна последователност на таргетен участък от *CD* housekeeping гена, използван като вътрешна контрола за амплификация на човешка/геномна ДНК.

В син цвят са маркирани:

- Нуклеотидна последователност на таргетен участък от *CD* housekeeping гена
- Олигонуклеотидни зародиши за амплификация на фрагмент от *CD* („forward“и „reverse“)
- Дължина на *CD* ампликона

3.2.7. Дизайн на праймери за PCR амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis.*

С цел специфична амплификация на таргетен фрагмент от генома на бактерията *Chlamydia trachomatis* в изследваните биологични проби (менструални тъкани/ ендометриални биопсии) бяха използвани специфично дизайнирани праймери. Използвахме нуклетидните секвенции от базите данни на NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ , както и програма за провеждане на виртуален PCR (PRIMER 3) http://simgene.com/Primer3. Праймерите бяха дизайнирани да хибридизират в прицелна ДНК последователност на криптичния плазмид *pLGV440* (Таблица 1. и Фиг.19.).

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на праимерите за амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* с детайлни параметри.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	**GCAAGATATCGAGTATGCGTTGTTAGG**	27	62.18	44.44	6.00	0.00
Reverse primer	**TTCATTGTACTCATTAAACGAGCGG**	25	59.94	40.00	7.00	1.00

NCBI Reference Sequence: NC_010029.2

>NC_010029.2:2224-3579 Chlamydia trachomatis plasmid pLGV440, complete sequence

ATGAAAACTCGTTCCGAAATAGAAAATCGCATGCAAGATATCGAGTATGCGTTGTTAGGTAAAGCTCTGA
TATTTGAAGACTCTACTGAGTATATTCTGAGGCAGCTTGCTAATTATGAGTTTAAGTGTTCTCATCATAA
AAACATATTCATAGTATTTAAATACTTAAAAGACAATGGATTACCTATAACTGTAGACTCGGCTTGGGAA
GAGCTTTTGCGGCGTCGTATCAAAGATATGGACAAATCGTATCTCGGGTTAATGTTGCATGATGCTTTAT
CAAATGACAAGCTTAGATCCGTTTCTCATACGGTTTTCCTCGATGATTTGAGCGTGTGTAGCGCTGAAGA
AAATTTGAGTAATTTCATTTTCCGCTCGTTTAATGAGTACAATGAAAATCCATTGCGTAGATCTCCGTTT
CTATTGCTTGAGCGTATAAAGGGAAGGCTTGACAGTGCTATAGCAAAGACTTTTTCTATTCGCAGCGCTA
GAGGCCGGTCTATTTATGATATATTCTCACAGTCAGAAATTGGAGTGCTGGCTCGTATAAAAAAAAGACG
AGCAACGTTCTCTGAGAATCAAAATTCTTTCTTTGATGCCTTCCCAACAGGATACAAGGATATTGATGAT
AAAGGAGTTATCTTAGCTAAAGGTAATTTCGTGATTATAGCAGCTAGGCCATCTATAGGGAAAACTGCTT
TAGCTATAGACATGGCGATAAATCTTGCGGTTACTCAACAGCGTAGAGTTGGTTTCCTATCTCTAGAAAT
GAGCGCAGGTCAAATTGTTGAGCGGATTATTGCTAATTTAACAGGAATATCTGGTGAAAAATTACAAAGA
GGGGATCTCTCTAAAGAAGAATTATTCCGAGTAGAAGAAGCTGGAGAAACAGTTAGAGAATCACATTTTT
ATATCTGCAGTGATAGTCAGTATAAGCTTAATTTAATCGCGAATCAGATCCGGTTGCTGAGAAAAGAAGA
TCGAGTAGACGTAATATTTATCGATTACTTGCAGTTGATCAACTCATCGGTTGGAGAAAATCGTCAAAAT
GAAATAGCAGATATATCTAGAACCTTAAGAGGTTTAGCCTCAGAGCTAAACATTCCTATAGTTTGCTTAT
CCCAACTATCTAGAAAAGTTGAGGATAGAGCAAATAAAGTTCCCATGCTTTCAGATTTGCGAGACAGCGG
TCAAATAGAGCAAGACGCAGATGTGATTTTGTTTATCAATAGGAAGGAATCGTCTTCTAATTGTGAGATA
ACTGTTGGGAAAAATAGACATGGATCGGTTTTCTCTTCGGTATTACATTTCGATCCAAAAATTAGTAAAT
TCTCCGCTATTAAAAAAGTATGGTAA

Фиг. 19. Нуклеотидна последователност на таргетен участък от *Chlamydia trachomatis* в pLGV440 криптичен плазмид.

- **Дължина на таргетен ампликон в генома на *Chlamydia trachomatis*: 364 bp.**
-

3.2.8. PCR амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген.

В Таблица 2. е посочена оптималната концентрация на компонентите в реакционната смес /PCR микс/ за мултиплексна амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* и *CD* гена (Таблица2.).

Таблица 2. Оптимална концентрация на компонентите в PCR реакционен микс за мултиплексна амплификация на *CD* таргетен генен регион и таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis*.

Компоненти на реакционната смес	Обем (μl)
ДНК	2
Праймер F/CD (10 pmol/μl)	0,2
Праймер R/CD (10 pmol/μl)	0,2

Праймер F/Ch.tr. (10 pmol/µl)	0,2
Праймер R/ Ch.tr. (10pmol/µl)	0,2
ddNTP (5mM)	1
10x Буфер	1
Taq DNA Полимераза	0,05
Дестилирана вода	До краен обем 10µl

Оптималната програма за провеждане на рутинен PCR за намножаване на таргетните фрагменти в *CD* гена и генома на *Chlamydia trachomatis* е посочена в Таблица 3.

Таблица 3. Оптимална PCR програма за мултиплексна амплификация на таргетни фрагменти в *CD* гена и генома на *Chlamydia trachomatis.*

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	45 сек	**29 цикъла**
Хибридизация на праймерите	60 °C	45 сек	
Синтез	72°C	45 сек	
Синтез	72°C	5 мин	
	15 °C	**+/- безкрайност**	

3.2.9. Детекция на таргетни ампликони на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген чрез електрофореза в агарозен гел.

В настоящото проучване метода беше приложен за анализ и интерпретция на резултатите относно *Chlamydia trachomatis* и housekeeping гена *CD*. Количеството и качеството на получените амплификационни продукти чрез PCR се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 3% агарозен гел и хоризонтална електрофорезна система. ДНК фрагментите се разделят в зависимост от молекулната им маса, като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер, спрямо който

се отчита дължината на намножения фрагмент. Маркерът се нанася успоредно на анализираните проби, като по този начин се определя дължината на продукта.

Визуализацията на получените продукти от PCR се осъществява чрез разтворения в агарозния гел етидиев бромид, който представлява интеркалиращ агент. Етидиевият бромид се вгражда между азотните бази в ДНК -молекулата и позволява визуализирането й, чрез облъчване с UV – светлина.

Използвани буфери:

1x TBE буфер: TRIS – 90 mmol/l; Борна киселина – 90 mmol/l; Na 2EDTA – 1 mmol/l Буфер за нанасяне на пробите: 0,25% бромфенол блу; 25% фикол Апаратура: За изливане на агарозния гел: Микровълнова фурна – SM 20MW, SOGO, China; нивелирна масичка; ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800 mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1 mm;

За провеждане на електрофорезата:

Апарат за хоризонтална подводна гел- електрофореза A. Hartenstein, Wuerzburg, Germany; токоизправител Consort EV222, Turnhout, Belgium; За визуализиране на пробите: Трансилюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria. За архивиране на получените резултати: Фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA.

3.2.10. Real time PCR амплификация на *Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8.*

Микроорганизмите *Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum, Mycomplasma hominis; Mycomplasma genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8* бяха амплифицирани чрез комерсиални диагностични китове със следните компоненти, обеми, концентрации в реакционния микс (Таблица 4.).

Таблица 4. Оптимален реакционен RealTime PCR микс за намножаване на таргетни участъци от следните патогени: *Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8.*

Компоненти на реакционната смес	Обем (μl)
Високомолекулна ДНК	10
PCR-mix-1-FL/2x /съдържа всички необходими буферни компоненти/	10

PCR-mix-2-FRT/2x / /съдържа специфични праймери за конкретен таргетен патоген и за намножаване на вътрешна контрола/	5
Ензим /Polymerase (TaqF)/	0,5
	До краен обем 25 µl

Стриктно бяха спазени инструкциите към технологичния протокол за рационална употреба на диагностичните китове на фирмата производител.

Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на следните патогени: *Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, EBV, CMV, VZV, HHV-6* е отразена в Таблица 5.

Таблица 5. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, EBV, CMV, VZV, HHV-6.*

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95ºC	15 мин	1
Денатурация	95ºC	5 сек	**5**
Хибридизация на праймерите	60 ºC	20 сек	
Синтез	72 ºC	15 сек	
Денатурация	95ºC	5 сек	**40**
Хибридизация на праймерите	60ºC	30 sec	
Синтез	72ºC	15 sec	

Real time PCR реакционният микс за амплифициране на следните вирусни фактори *HSV1/2, HHV-7, HHV-8* е напълно идентичен с останалите патогени, които се амплифицират с комерсиални диагностични китове, но Real time PCR програмите са различни. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *HSV1/HSV2* е отразена в Таблица 6.

Таблица 6. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация *HSV1/HSV2.*

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95ºC	15 мин	1
Денатурация	95ºC	20 сек	**5**
Хибридизация на праймерите	60 ºC	20 сек	
Синтез	72 ºC	15 сек	
Денатурация	95ºC	20 сек	**40**
Хибридизация на праймерите	60ºC	30 sec	
Синтез	72ºC	15 sec	

Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *HHV-7* е отразена в Таблица 7.

Таблица 7. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *HHV-7.*

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална стъпка	50 ºC	15 мин	1
Денатурация	95 ºC	15 мин	
Денатурация	95 ºC	10 сек	**45 цикъла**
Хибридизация на праймерите	60 ºC	25 сек	
	10 ºC	**+/- безкрайност**	

Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *HHV-8* е отразена в Таблица 8.

Таблица 8. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на *HHV-8.*

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална стъпка	80 °C	30 сек	1
Денатурация	94 °C	1,30 мин	
Денатурация	94 °C	30 сек	**5 цикъла**
Хибридизация на праймерите	64 °C	45 сек	
Денатурация	94 °C	10сек	**45 цикъла**
Хибридизация на праймерите	64 °C	45 сек	
	10 °C	**+/- безкрайност**	

3.2.11. Real time PCR амплификация на ендометриален микробиом.

Анализите бяха проведени посредством комерсиален диагностичен кит, които се базира на количествено определяне на коменсална, аеробна и анаеробна бактериална фракция, като част от бактериите са опортюнистични. Съществено значение има нивото на фракцията от р. *Lactobacillus,* тъй като играе роля на защитна коменсална популация в женския генитален тракт. Всяка бактериална фракция, включена в панела е представена в строго пропорционална зависимост спрямо общата бактериална маса, коменсалната популация лактобацили и спрямо вътрешната контрола, отразяваща набогатеността на пробата, като брой клетки. Разнообразните мрежови връзки и взаимодействия между коменсалните, анаеробни и аеробни микроорганизми, включени в панела позволяват охарактеризирането на различни клинични състояния от нормоценоза до умерена или силно изявена/ остра дисбактериоза. Посредством анализа се доказва ендометриална колонизация и последващо възпаление на женски горен генитален тракт /по-точно ендометриум/.

Real time PCR протоколът за амплификация на ендометриален микробиом беше спазен стриктно спрямо инструкциите за употреба на комерсиалния диагностичен кит. Тъй като обхвата на панела е широк и включва разнообразни патогени, специфичните праймери и компоненти за амплификацията им са заложени предварително в стрип, готов за употреба. Всяка бактерия или бактериална група за последваща амплификация е разпределена в отделна ямка, респективно PCR реакция на стрипа. Към всяка ямка се прибавят единствено 10 µl Taq Pollymerase solution разтвор и 5µl тотална ДНК.

Бактериите в обхвата на панела са разпределени по групи по следния начин:

Нормална микрофлора:

- Lactobacillus spp.,

Факултативни анаеробни микроорганизми:

- Enterobacterium spp.,
- Streptococcus spp.,
- Staphylococcus spp.,

Облигатни анаеробни микроорганизми:

- Gardnerella vaginalis., Prevotella bivia., Porphyromonas spp.,
- Eubacterium spp.,
- Sneathia spp., Leptotrichia spp., Fusobacterium spp.,
- Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp.,
- Lachnobacterium spp., Clostridium spp.,
- Mobiluncus spp., Corynebacterium spp.,
- Peptostreptococcus spp.,
- Atopobium vaginae.,

Микоплазми:

- Ureaplasma urealyticum., Ureaplasma parvum.,
- Mycoplasma hominis.,
- Mycoplasma genitalium.,
-

Микози:

Candida spp.,

Идентификацията на *Gardnerella vaginalis* доминираща инфекция при вариант на позитивен резултат на бактерията в комбинация *Gardnerella vaginalis., Prevotella bivia., Porphyromonas spp.,* както и разграничение на *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* беше извършена чрез RealTime PCR комерсиален диагностичен кит, описан в същата глава Материали и методи. Липсата на *Prevotella bivia., Porphyromonas spp.,* от комбинацията беше установено чрез микробиологично култивиране. Данните от микробиологичното култивиране са предоставени от медицинския ни колаборатор.

Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на коменсални, анаеробни и аеробни микроорганизми е представена в Таблица 9.

Таблица 9. Оптималната Real time PCR програма за специфична амплификация на коменсални, анаеробни и аеробни микроорганизми.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална стъпка	80 °C	30 сек	1
Денатурация	94 °C	1,30 мин	
Денатурация	94 °C	30 сек	**5 цикъла**
Хибридизация на праймерите	64 °C	15 сек	
Денатурация	94 °C	10сек	**45 цикъла**
Хибридизация на праймерите	64 °C	45 сек	
	10 °C	**+/- безкрайност**	

Real Time PCR амплификацията на таргетните бактериални/вирусни патогени с изключение на *Chlamydia trachomatis* (амплифицира се с конвенционален PCR) беше проведена чрез стриктно спазване на технологичните протоколи към комерсиалните диагностични китове. Real Time PCR анализите бяха проведени в триплика с цел да бъдат покрити възможни концентрационни вариации относно броя копия инфекциозен геном, отговарящи на гранично, близко до cut off на теста прагово ниво за съответния патоген.

Чрез приложението на специално разработен софтуер за визуализация, интерпретация, числово и/или графично представяне на резултатите, суровите данни бяха обработени и фотодокументирани. В проучването са взети предвид единствено ясно диференцираните активни бактериални и вирусни инфекции, отговарящи на умерена и силно изявена активна инфекция. Подобно заключение се прави на база Ct- value на позитивния сигнал/резултат за съответния патоген. Разбира се при анализа на Real Time PCR резултатите щателно бяха анализирани и вида на графиките. В случай на неспецифична амплификация и нарушен спрямо оптималния графичен изглед вид на сигнала, беше извършено резонно повторение. В цялата извадка не беше регистриран случай на липсващ или спорен сигнал за амплификация на контролен ген вследствие на PCR инхибитори или неправилно проведена методична процедура.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ:

4.1. Подбор на клинични групи и изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването, съдържащи подробна медицинска информация, асоциирана с безплодие.

Клинични групи

Обект на молекулярно-инфектологични изследвания в настоящия дисертационен труд бяха 335 жени с български произход. Възрастта на пробандите е 22-49 години.

Изследваните жени бяха разпределени в три клинични групи спрямо вида биологичен материал и анамнеза за репродуктивна несполука, включваща конкретни патологии и придружаваща медицинска информация за здравен статус, асоцииран с безплодие (Таблица 10.). Средният период на безплодие при инфертилните групи е 1,5-7,5 години.

Таблица 10. Клинични групи, участващи в проучването.

Клинична група	**Диагноза:**	**Анамнеза:**	**Бр. пациенти:**	**Биологична проба:**
Инфертилна	**Безплодие**	• Рекурентни спонтанни аборти • Трудности в естествената концепция • Физиологична обструкция на анатомични отдели на женския генитален тракт, /резултат от възпаление или хирургични интервенции/ • Неуспешни IVF процедури • Наличие на автоимунно заболяване и/или други придружаващи заболявания и др.	**180**	**Менструална тъкан**
Инфертилна контрола	**Безплодие**	• Единствено история на спонтанен аборт или рекурентни спонтанни аборти • Липса на каквито и да е допълнителни здравословни проблеми, свързани с репродуктивна несполука.	**65**	**Ендометриална биопсия**

Здрава контрола	Липсва проблем с безплодие	• ЛИПСВА	**90**	**Менструална тъкан**

Изборът на менструална тъкан, като целева биологична проба в настоящата дисертация е оптимален вариант поради факта, че класическите биологични проби, информативни за състоянието на ендометриума (ендометриални биопсии) са инвазивни. Следователно ендометриалните биопсии не са рутинна опция в медицинската практика, особено за оценка на инфекциозен статус на горен генитален тракт. Поради тази причина, както и с цел минимизиране на възможността за скрити недиагностицирани инфекции на ендометриума, беше избрана менструалната тъкан, като неинвазивна и репрезентативна биологична проба за горен генитален тракт. Менструалната тъкан съдържа части от функционалния слой на ендометриума (децидуа) и обхваща специфичния периметър на вирусна/бактериална активност и имплантация на бъдещия ембрион.

Клиничната група, тествана с биологична проба менструална тъкан обхваща 180 жени, селектирани на база тяхната история на безплодие: повтарящи се спонтанни аборти, затруднения в естественото забременяване, физиологична обструкция на определени анатомични отдели от женския генитален тракт, в резултат на възпаление или усложнения след хирургични интервенции, неуспешни процедури за асистирана репродукция, наличие на автоимунни и други придобити заболявания и др. Селектираните 180 български жени с безплодие са с негативен статус по отношение на целевия бактериален/вирусен панел в долен генитален тракт. Негативният статус беше установен чрез изследване на цервико-вагинални тампони и е водещ критерий за включване на пробандите в проучването. Тази селекция представлява гаранция за липса на привнесени инфекции от долен генитален тракт в менструалната тъкан по отношение на таргетния панел.

Инфертилната контролна група, представена от жени с ендометриални биопсични проби, цели да се извърши сравнителен анализ с инфертилната група, за да демонстрира възможността менструална тъкан да се използва като неинвазивна биологична проба, аналогична като рерпрезентативност на инвазивната ендометриална биопсия.

<u>Изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването</u>

Личните данни на пациентите и подписаните от тях информирани съгласия се съхраняват в отделни класьори, на място, до което имат достъп само водещият изследовател и членовете на изследователския екип по настоящата разработка, т.е преките научни ръководители на докторанта. Бяха спазени стриктно изискванията за защита на личните данни при извършването на изследователската работа заложена в дисертацията. Чрез утвърдената система за архивиране и контрол се избягват потенциални рискове за нарушение в сигурността на личните данни.

Бяха изготвени подробни пациентски досиета на инфертилните български жени в извадката, чрез стриктно приложение на създадената анкетна карта (виж Материали и методи, Образец 1.). На база вида биологичен материал и снетата анамнеза на безплодие чрез приложената анкетна карта бяха формирани клиничните групи в настоящата разработка.

В досиетата беше поместена подробна информация, свързана с диагнозата безплодие, като: период и причини за стерилитет, хормонален статус, излагане на вредна околна или професионална среда, стил на живот, история на инфламаторни заболявания на уро-генитален тракт, хирургични интервенции върху анатомичните отдели на женската полова система, наличие/липса на автоимунни заболявания и/или други придружаващи заболявания, информация за проведени клинични, образни, генетични изследвания, имащи отношение към проблеми с репродукцията и проведени лечения.

Освен хартиени носители с информацията от приложената анкета, беше създадена и попълнена електронна такава. Медицинската информация беше систематизирана и в електронен вид с цел по-лесна достъпност и двойно подсигуряване. На база анкетните данни се изготвиха няколко вида информативни и оперативни работни таблици. Тяхното предназначение е архивиране и оптимална интерпретация на медицинска информация от приложението на прицелния бактериално-вирусен панел.

Представен е образец на един тип работна таблица, използвана успешно по време на разработката за обобщение, корелация и интерпретация на резултати (Таблица 11.).

Таблица 11. Клинико-патологични данни при инфертилна група

Проба	Репрод. анамнеза	П-д на безпло-дие	Молекул. резултати относно инфекцио-зен статус	Инфекциозни заболявания /ретроспекти-вен и настоящ статус/	Генетич-ни резултати	Автоимунни заболява-ния	Придружаващи заболявания и лечение	Нива NK клетки	Неуси
МТ-1*	● Трудности в естествено забременяване	5	HHV-7	Чести цистити в миналото	-	Болест на Хашимото			
МТ-2	● Трудности в естествено забременяване:. ● 1 спонтанен аборт: 9 г.с.	3	ОТРИЦАТЕЛЕН (-)	-	Рисков молекуляр ен профил за тромбофи лия		Хормонална яйчникова стимулация	↑нива на NK	1
МТ-3	● Повтарящи се ранни спонтанни аборти 12 г.с.	7,5	EBV	-		Болест на Хашимото	Терапия с L-тироксин		

МТ -4	● Трудности в естествено забременяване ● 1 спонтанен аборт 22 г.с.	15	UP/GV/HHV-7	Чести цистити в миналото и партньор с положителна инфекция с GV и UP	-	Болест на Хашимото	Терапия с L-тироксин		
МТ-5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

*** МТ- Менструална тъкан**

В подробните пациентски досиета са поместени резултати от разнообразни биохимични, клинични, образни, гинекологични и др. изследвания. Резултатите, предоставени от самите пробанди бяха приложени към досиетата под формата на хартиени копия или електронни копия (дискове от ехографии и др). Досиетата съдържат и медицински становища, епикризи, резолюции и др.

Поради ефективното ни професионално сътрудничество с медицинските колаборатори по настоящия дисертационен труд, прибавихме към досиетата и допълнителни детайли, снети, като съществени по преценка на специалистите-гинеколози.

Това позволи откроването на интересни клинични случаи. В хода на разработката към досиетата бяха прибавени и резултатите от диагностиката на таргетните бактериални и вирусни патогени *(Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8)* и ендометриален микробиом. Разбира се всички пробанди бяха своеовременно информирани за резултатите им посредством медицинските ни колаборатори. Това позволява приложението на адекватна терапия.

-

4.2. Оптимизиране на молекулярно-биологична методика за изолиране на тотална ДНК от биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия.

С цел подбор на най-добра екстракционна методика за проби от менструална тъкан и ендометриална биопсия, бяха сравнени данните от следните три вида ДНК изолиране:

<u>Фенол-хлороформ метод за ДНК екстракция</u>

Фенол-хлороформ екстракция беше използвана като златен стандарт за извършване на сравнителен анализ и последващ избор на методика с най-добри ектракционни параметри. ДНК екстракцията беше извършена по вътрешно-лабораторен протокол /виж Материали и методи/.

<u>Комерсиална екстракция с AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic</u>

За изолиране на тотална ДНК от менструални тъкани и ендометриални биопсии беше приложена екстракция с комерсиален кит- AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic. Бяха спазени стриктно инструкциите за рационална употреба. Последва спектрофотометрично определяне на ДНК добива, както и проверка на изолираните матрици чрез NanoDrop техника с цел прецизен анализ на параметрите концентрация и чистота на ДНК. Получените резултати не бяха задоволителни.

Оптимизация на комерсиална екстракция с AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic

Бяха въведени 2 оптимизиращи модификации към оригиналния алгоритъм за изолиране на тотална ДНК с комерсиален кит с цел постигане на възможно най-добър добив на висококачествена, пречистена геномна (човешка) и екзогенна (бактериална/вирусна) ДНК. На първо място беше използван 15mg/µl Glycogen (Ambion, Life Technologies, USA), като носител на ДНК-матрицата, който се прибавя едновременно със сорбента в стандартната процедура към вече лизираните ендометриални клетки. Също така бяха въведени 2 допълнителни стъпки на промиване след приключване на стандартните процедури с миещи разтвори към комерсиалния кит. Допълнителните стъпки са прибавяне на 250µl 75% EtOH и последващо центрофугиране за 30секунди/10 000 об. двукратно.

Екстракционните параметри бяха отлични, като припокриха данните от контролната фенол-хлороформ екстракция.

Поради по-бързото, безвредно и лесно изолиране на ДНК в настоящият труд бе предпочетен вариантът с оптимизация на комерсиалната ДНК екстракция с AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic.

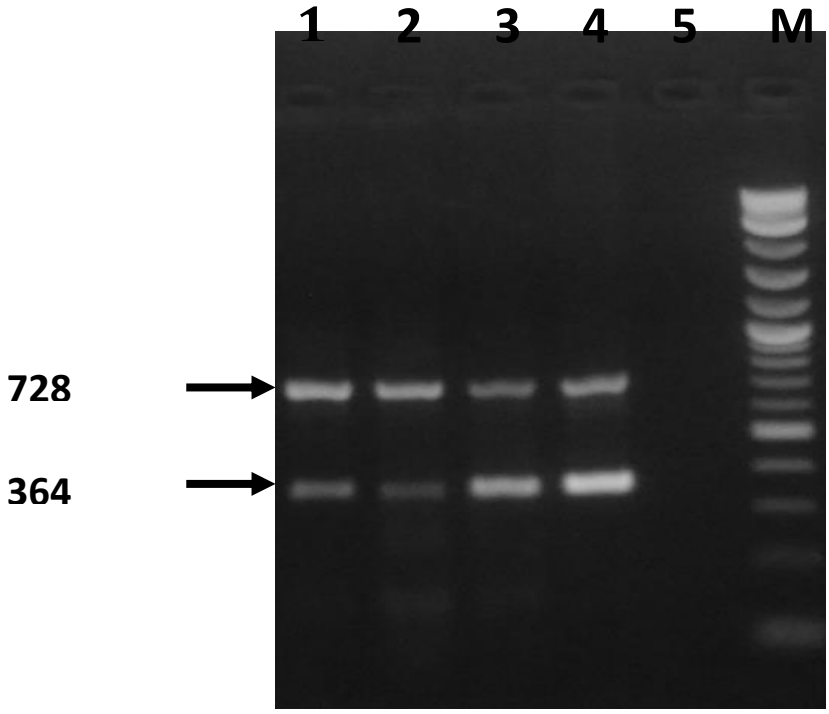
4.3. Въвеждане на молекулярно-биологична методика за амплификация на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген.

Основен мотив при дизайна на праймери за амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* с големина 364 б.дв. /виж Материали и методи/ беше постигане на най-висока чувствителност и специфичност за идентификация на патогена. След сериозно литературно проучване, анализ на бази данни и използване на специални приложения за виртуален PCR, се дизайнира двойка праймери, комплементарни на специфични секвенции в криптичния плазмид *pLGV440* на бактерията *Chlamydia trachomatis*. Криптичният плазмид *pLGV440* е представен в много на брой копия в генома на *Chlamydia trachomatis,* което го прави изключително подходящ кандидат за детекция на хламидийна инфекция, повишавайки чувствителността на анализа. Криптичният плазмид *pLGV440* показва и много висока степен на консервативност, което е от особена важност при избор на таргетни секвенции за хибридизация на праймери в бактериален геном. Причината е, че всеки бактериален геном без изключение се характеризира с изключително

висока мутабилна изменчивост. Тези характеристики се обясняват с липсата на строги системи за ДНК репарация при прокариотните микроорганизми, но също така и, като част от пътя им към еволюционно и адаптационно усъвършенстване. Беше разработен мултиплексен вариант на PCR реакция с две двойки праймери за едновременно намножаване на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* и *CD* housekeeping ген. Целта на едновременната амплификация на вътрешната ендогенна контрола и прицелния бактериален патоген *Chlamydia trachomatis* в обща реакция е НЕ само проверка за наличие на достатъчно клетки, но и избягване на фалшиво-отрицателни резултати вследствие PCR инхибиция.

Бяха проведени оптимизации за определяне на най-подходящата температура на праймерна хибридизация за двете двойки праймери чрез градиентен PCR.

Бяха взети предвид данните за индивидуалните характеристики на двете двойки праймери, като: % на GC, риск от самосдвояване, праймерна димеризация, генериране на хетеродуплекси и др. фактори от приложението на виртуален PCR. Като резултат, приложихме градиентния PCR в широк температурен диапазон (55-64 ºC) и определихме най-оптимална температура на хибридизация на двете двойки праймери 60 ºC. При тази температура двата фрагмента: бактериален PCR продукт, специфичен за *Chlamydia trachomatis* и *CD* гена за човешка геномна ДНК се амплифицираха най-добре без неспецифични амплификати, с най-висока дискретност на фрагментите (Фиг. 20.). Не на последно по значение място беше запазена високата чувствителност на анализа за идентификация на *Chlamydia trachomatis.* В резултат беше генерирана опималната PCR програма за намножаване на таргетния патоген *Chlamydia trachomatis* и *CD* (виж Материали и методи).



Фиг. 20. Позитивен резултат за *Chlamydia trachomatis* на агарозен гел. Визуализират се два PCR продукта:

- **Фрагмент от *CD* гена, използван като housekeeping ген-728 б.дв.**
- **Фрагмент от генома на *Chlamydia trachomatis*- 364 б.дв.**
- **Позитивни за *Chlamydia trachomatis* проби /външен контрол/ и наличие на *CD* генен фрагмент: /1-4 старт/.**
- **Негативна контрола /5/.**
- **Маркер за оразмеряване/М/.**
-

След преминаване на референтен външен контрол към *INSTAND EV EQAS* за молекулярна диагностика на *Chlamydia trachomatis* се убедихме, че именно с таргет в криптичния плазмид *pLGV440* се постига много висока диагностична ефективност.

4.4. Определяне обща честота на инфекция с таргетниия вирусно-бактериален панел в клиничните групи.

Всички проби от клиничните групи бяха анализирани за наличие на таргетните за настоящата дисертация патогени: *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*. Резултатите от молекулярно-инфектологичните изследвания са съобщени в 3 публикации [Mesechkova et al., 2023].

В 61,1 % от инфертилната клиничната група (180 безплодни жени, тествани с менструална тъкан), беше детектиран позитивен инфекциозен статус за прицелния бактериално-вирусен панел. В 48,8 % от всички изследвани проби беше открита бактериална инфекция, докато 22,2 % от пробите бяха позитивни за вирусни инфекциозни фактори.

Контролната инфертилна група (65 безплодни жени, тествани с ендометриална биопсия), демонстрира 64,53% позитивни случаи, от които 49,23% с бактериална и 15,3% с вирусна инфекция.

Здравата контролна група, състояща се от менструално-тъканни проби на 90 жени без репродуктивен неуспех или заболявания, асоциирани с безплодие, се оказа 100 % негативна по отношение на целевия диагностичен панел.

Наблюдаваните сходни проценти на положителни за инфекции пациенти в инфертилната група (61,1%), изследвани с менструална тъкан и (64,53%) в контролната инфертилна група, изследвани с ендометриална биопсия, както и тяхното процентово разпределение между вирусна и бактериална фракция, демонстрират репрезентативността на неинвазивната менструалната тъкан като представителна проба за горен женски генитален тракт и потвърждават възможността същата да бъде използвана вместо инвазивна ендометриална биопсия.

Докладваният отрицателен инфекциозен статус при 100% от изследваните здрави контроли, ясно сочи за негативно влияние на таргетния инфекциозен панел върху безплодието при жени.

4.5. Определяне на клинико-патологичен статус и видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) в менструална тъкан от инфертилни жени /клинична инфертилна група/.

<u>Клинични и патологични данни, асоциирани с безплодие при инфектираните с таргетните бактериални/вирусни патогени пробанди в клиничната инфертилна група.</u>

От всички позитивни за таргетните бактериално-вирусни инфекции пробанди, 49% са с история на спонтанни аборти, като 27,7% са имали единичен спонтанен аборт и 72% са имали 2 или повече спонтанни аборта. В 11,1% от инфектираната инфертилна клинична група спонтанните аборти са настъпили в преембрионален стадий (до 5-та гестационна седмица), в 61,1% в ембрионален стадий (5-та-10-та гестационна седмица) /ранни спонтанни аборти/ и в 27,7% в (16-та-27-ма гестационна седмица) /късни спонтанни аборти/.

Изненадващо наблюдение в разработката беше наличната история на спонтанни аборти и в 64% от пробандите с негативен инфекциозен статус. Възможно е тези пробанди да са били с положителен инфекциозен статус към датата на настъпване на аборта, но към момента да не се докладва такъв, поради проведена терапия или липса на настояща вирусна реактивност.

При 35,7% от позитивните за таргетните бактериално-вирусни инфекции пациентки се съобщава за трудности в забременяването.

Автоимунни заболявания са регистрирани при 19,4% от всички изследвани пробанди и при 20% от инфектираните пациенти. В групата на инфектираните пациенти с история за спонтанни аборти 33,3% са диагностицирани с автоимунни заболявания, докато в групата с трудности в забременяването - 7,14% страдат от автоимунни патологии (Таблица 12.).

Различни придружаващи заболявания са докладвани при 13,8 % от всички изследвани пациенти с репродуктивни проблеми в клиничната инфертилна група. Повечето от диагнозите се асоциират със стерилитет директно или индиректно.

15,5% от цялата група от тях са активни пушачки, но 11,1 % са съсредоточени именно в позитивните за инфекции пробанди.

Таблица 12. Клинични и патологични данни, асоциирани с безплодие при инфектираните с таргетните бактериални/вирусни патогени пробанди- клинична инфертилна група.

Характеристики	Инфектирани пробанди с история на спонтанни аборти
Със спонтанен аборт/аборти	49,0%
Единичен аборт	27,7%
2 или повече аборти	72,3 %
До 5-та гестационна седмица	11,1%
5-та-10-та гестационна седмица	61,1%
16-та-27-ма гестационна седмица	27,7%
Неуспешни IVFs	20,4 %
Автоимунни заболявания	33,3 %
Период на безплодие	1,5-7,5 г.
	Инфектирани пробанди с трудности в естествената концепция
Период на безплодие	1,5-15 г.
Неуспешни IVFs	3,57 %
Автоимунни заболявания	7,14 %

Честотата на автоимунните заболявания, определена в изследваната извадка безплодни пробанди е 19,4%. Спектърът на автоимунните заболявания включва различни диагнози: болест на Хашимото, целиакия, хипертиреоидизъм, синдром на Ашерман, метаболитен синдром, антифосфолипиден синдром, болест на Рейно, псориазис. Болестта на Хашимото е най-разпространеното автоимунно заболяване, докладвано при изследваните пациенти. Повечето от автоимунните заболявания 33,3%, особено болестта на Хашимото са концентрирани в групата на инфектираните пробанди с анамнеза за ранни или късни аборти и 7,14% в пробандите с трудности при зачеването.

Високият процент (33,3%) на инфектирани инфертилни пациенти, страдащи от автоимунни заболявания, докладван в текущото проучване не е изненадващ. Може да се заключи, че автоимунните заболявания, в частност Хашимото, оказват допълнително негативно влияние върху състоянието на стерилитет. Причината за това се корени не само в комплицирания статус на имунокомпроментираност на пробандите. Дълговременното лечение на този тип автоимунни заболявания със стероидни, кортикостероидни, хормонални терапевтични препарати, привнася допълнителен отрицателен ефект в проблемите на безплодието, включително и чрез медикаментозно провокирана вирусна реактивация [253-254].

Бяха докладвани 20,4% неуспешни IVFs в групата на инфектираните пробанди с анамнеза на спонтанни аборти и 3,57% при пробанди с трудности в естествената концепция. За основна причина на неуспешни IVFs се счита бактериалната или по-често вирусната реактивация в ендометриум вследствие на хормоналната стимулация. Тъй като голям процент на неуспешни IVFs 20,4% се концентрират в пробандите с анамнеза на спонтанни аборти и са позитивни за таргетните инфекции, се счита, че механизмът на хормонална реактивация на патогените в ендометриум има съществена роля.

Различни придружаващи заболявания бяха докладвани при 13,3 % от всички изследвани пациенти с репродуктивни проблеми, разпределени в следните подгрупи: алергия, ендометриоза, запушване на маточните тръби, инсулинова резистентност, синдром на поликистозни яйчници, желязодефицитна анемия, таласемия минор, генетичен рисков профил на тромбофилия, бронхиална астма, отосклероза, аденом на хипофизата, хипопитуитаризъм, носителство на хемофилия. Най-честите диагнози са непроходимост на тръбите и поликистозни яйчници. Това не е изненадващо за кохортата на изследваните пациентки в извадката, тъй като тези придобити заболявания са пряко свързани с безплодие и докладвани, като най-честите причини [10].

В проучването се натрупаха спорадични данни за повишени нива на NK клетки при изследваните безплодни пробанди, малка пропорция от които със субклинична виремия за *EBV* и *HHV-6*. Не могат да се направят категорични изводи.

<u>Видово-специфична честота на разпространение на бактериални и вирусни инфекции в позитивната извадка на инфертилната клинична група.</u>

Инфекции с бактерията *Ureaplasma parvum* бяха открити в 61,36 % , а с *Gardnerella vaginalis* в 69,31 % от всички позитивни бактериални случаи. Активна инфекция с *Mycomplasma hominis и Ureaplasma urealyticum* беще детектирана с еквивалентна честота 2,27 % от позитивните за бактериални патогени менструални тъкани.

При 42,5 % от тестваните пробанди, положителни за вирусна инфекция е открито наличие на *HHV-7*. Активна инфекция с *EBV* беше детектирана в 40% от позитивните вирусни случаи. В същата клинична група на позитивни за *HHVs* пробанди бяха детектирани: *HHV-6* в 10 %, CMV в 7,5 % и *HSV2* само в 2,5 % от случаите.

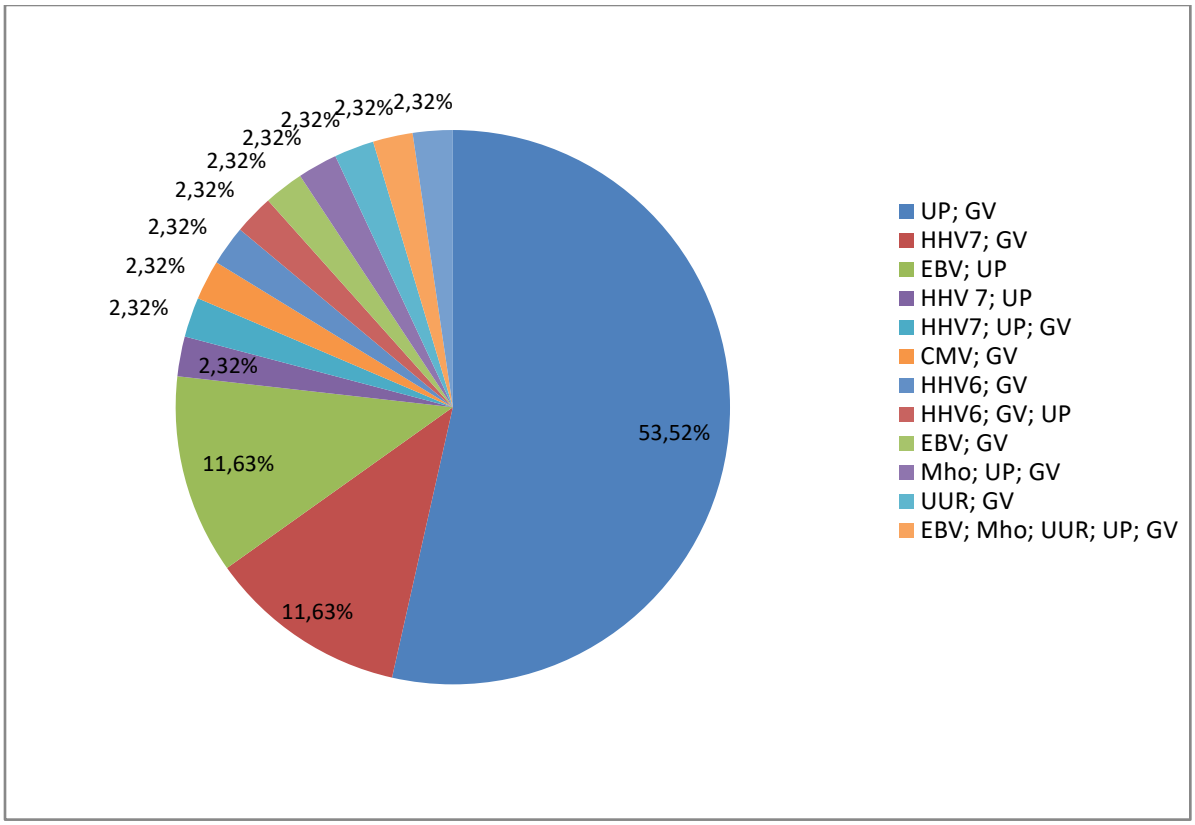
Следните бактериални и вирусни патогени не бяха открити в нито една от менструалните тъкани на изследваните пробанди: *Chlamydia trachomatis, Mycomplasma genitalium, HSV1, VZV и HHV-8* (Таблица 13.).

Таблица 13. Видово-специфична честота на разпространение на бактериални и вирусни инфекции в позитивната извадка на инфертилна клинична група.

Патоген	Брой позитивни инф. случаи в извадката	Процент %
Ch.tr.	0	0 %
MHO	2 (88)	2,27 %
MGE	0	0 %
UUR	2 (88)	2,27 %
UP	54(88)	61,36 %
GV	61(88)	69,31 %
HSV1	0	0 %
HSV2	1 (40)	2,5 %
EBV	16 (40)	40 %
CMV	3 (40)	7,5 %
VZV	0	0 %
HHV-6	4 (40)	10 %
HHV-7	17 (40)	42,5 %
HHV-8	0	0 %
Бактериална инфекция	88 (110)	80 %
Вирусна инфекция	40 (110)	36,3 %

В разработката беше установено състояние на ко-инфекция при 39,9 % от всички позитивни за инфекции случаи. Най-честите варианти на ко-инфекция са: *UP/GV* – 53,48 %; *HHV-7/GV* - 11,62 %, *EBV/UP*- 11,62 %. Следните комбинации са открити с еквивалентна

честота - 2,32 %: *HHV-7/UP*, *HHV-7/UP/GV*, *CMV/GV*, *HHV-6/GV*, *HHV-6/GV/UP*, *EBV/GV*, *MHO/UP/GV*, *UUR/ GV*, *EBV/MHO/UUR/UP/GV*, *EBV/HHV-7/UP* (Фиг. 21.).



Фиг 21. Честота на ко-инфекция с бактериално-вирусна етиология в инфектираните пробанди, изследвани с биологична проба: менструална тъкан.

Интерпретация и обобщение на молекулярно-инфектологичните данни на инфертилни жени, анализирани с менструална кръв.

Chlamydia trachomatis НЕ беше детектирана в прицелната ни извадка пробанди, което е в противоречие с публикуваните данни за най-широко разпространение на гениталните инфекции с *Chlamydia trachomatis* [72; 82]. Получените от нас данни биха могли да намерят обяснение в подбора на пробанди с отрицателен цервико-вагинален статус по отношение на *Chlamydia trachomatis*, което гарантира липсата на контаминация на менструалната проба. Подобен селективен критерий липсва в почти всички други проучвания. Отделно, част от цитираните литературни данни касаят изследвания, извършени върху биологичен материал - цервико-вагинален секрет, репрезентативен за инфекция в долен генитален тракт и неиндикативен за налична инфекция в ендометриума и асоциативно безплодие.

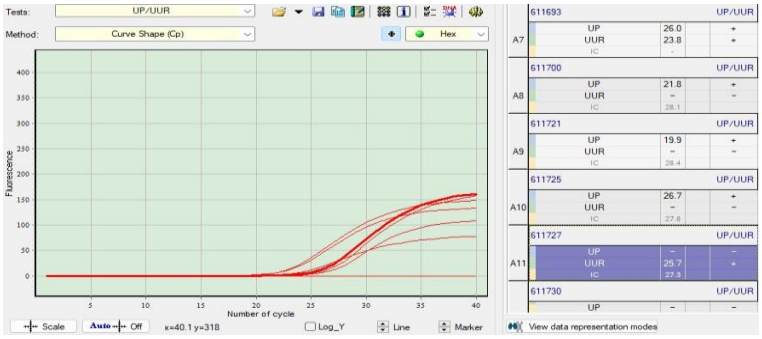
Съществена причина за установеното несходство в резултатите е и анамнезата за провеждано антибиотично лечение при голяма част от пациентите в проучването с данни за безплодие. Повечето от изследваните пациентки, позитивни за инфекция с *Ureaplasma parvum, Gardnerella vaginalis* или варианти на ко-инфекция *Ureaplasma parvum/Gardnerella vaginalis* (в комбинация с вирусни фактори: *EBV, HHV-6/7, CMV* или без) се характеризират с положителна анамнеза за лечение на хламидийна инфекция, повишени *IgG* хламидийни антитела.

Въпреки, че в изследваните пробанди, наблюдаваните клинични усложнения НЕ могат да се обяснят с директна текуща инфекция с бактерията *Chlamydia trachomatis,* причината за репродуктивната несполука в тези случаи е комплексна и инфекциозната етиология определено има значително влияние. Твърде вероятно е, инфекции с патогени, като *Chlamydia trachomatis* да са вече излекувани и елиминирани към настоящия момент, но последиците от тях да играят роля, като етиологичен фактор в комплицираната картина на неизяснен стерилитет.

Mycoplasma hominis и Ureaplasma urealyticum бяха детектирани в 2,27 % от бактериално заразените менструални тъкани (Таблица 13.).

Докладваните данни от настоящата разработка не съвпадат с публикуваните резултати от Michou и екип, според които 13.7% от менструалните тъкани на инфертилни жени са позитивни за *Mycoplasma hominis* и 18.3% за *Ureaplasma urealyticum* [72]. В изследването на Mousavi и сътрудници наличие на *Mycoplasma hominis* е докладвано в 2,9 % при стерилни жени, с неизяснена причина, тествани върху ендоцервикални проби, което се доближава до детектирания процент на разпространение 2,27% в настоящото проучване [153].

По отношение на *Ureaplasma urealyticum* докладваният висок процент на 37,5% позитивни стерилни жени в проучването на Mousavi, както и 17,2% при жени, претърпели *in vitro* пложданe по данни на Witkin, превишава значително детектираните честоти в настоящата дисертация 2,27% (Фиг. 22.) [152-153]. Резултатите за детектираните честоти на *Ureaplasma urealyticum* 54, 3% и *Mycoplasma hominis* 30,4 % при безплодни пациентки, хоспитализирани поради аборт в друго ретроспективно изследване също не съвпадат с докладваните в настоящото проучване. Allanson и екип детектират генома на *Ureaplasma urealyticum* в 25% и *Mycoplasma hominis* и *group B Streptococcus* в 11,1%, изследвайки гестационни тъканни проби вследствие на аборт (хорион, амнион, пъпна връв), което не кореспондира с докладваните данни в разработката [149-151].



Фиг. 22. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *Ureaplasma urealyticum*

Наблюдаваните различия се приемат за нормални поради явни различия в научната постановка, засягащи вида и чистотата на придобиване на биологичен материал.

Влагалищното присъствие на генитални микоплазми е често и се приема за нормофлора до определено микробно число. Установените разлики между настоящето проучване и литературните източници се приемат за нормални поради факта, че данните, ползвани за сравнение идват предимно от обследване на долен генитален тракт, макар и при жени с репродуктивна несполука, което е в противоречие с нашата теза и изследване върху проби от менструална тъкан и ендометриална биопсия.

Поради честата влагалищна честота и рискът от контаминация на ендометриалните проби, в клиничните групи на настоящето проучване, бяха включени само и единствено жени с отрицателен влагалищен инфекциозен статус по отношение на *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* и относно останалите таргетни патогени. Такава характерна особеност на изследването представлява своеобразно сито и пречиства извадката по отношение на данни за долен генитален тракт, което би било в противоречие с оценка пряката връзка генитални микоплазми - безплодие. В публикациите с изследвания от горен генитален тракт, прави впечатление, че определяне на долен генитален инфекциозен статус липсва, което вероятно завишава публикуваните честоти, поради контаминация на менструалните проби от влагалище.

Mycoplasma genitalium

Инфекция с *Mycoplasma genitalium* не беше открита в нито една пациентка в проучването.

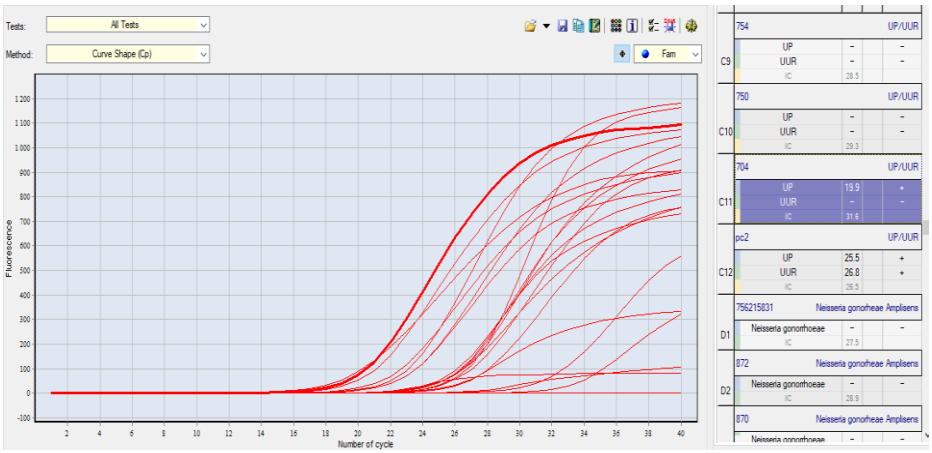
Негативният статус на изследваните менструални тъкани и ендометриални биопсии относно инфекция с *Mycoplasma genitalium* е нормално, предвид факта, че това е типично полово-предавана бактерия, а пробандите са многократно тествани за полово-предавани инфекции по пътя на обследване и разрешаване на репродуктивните си проблеми.

Трябва да се вземе предвид, че за позитивна асоциация на инфекцията с *Mycoplasma genitalium* с преждевременно раждане, спонтанен аборт и безплодие съществуват, както категорични, така и спорни доказателства от различни доклади [73]. Важна характеристика е липсата в анамнезата на изследваните пациентки на патологични състояния - тазово-възпалителна болест и клиничен цервицит, при които се докладват значително по-висока честота на инфекция с бактерията [163; 165].

Имайки предвид това, както и принципно ниската честота на *Mycoplasma genitalium,* установена при анализ на много по-големи пациентски кохорти, 4-5,9 % в “case-control” изследвания, се счита за съвсем нормално в 180 инфертилни български пациентки да липсва позитивна инфекция с *Mycoplasma genitalium.*

Ureaplasma parvum

Резултатите в настоящия дисертационен труд разкриха позитивен инфекциозен статус на менструалните тъкани за *Ureaplasma parvum* при 30 % от изследваните пробанди или 61,36 % от всички положителни бактериални проби (Фиг. 23).



Фиг. 23. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *Ureaplasma parvum.*

По литературни данни, колонизация с *Ureaplasma parvum* бива идентифицирана в: плацента, амниотична течност [123], фетална кръв и пъпна връв, фетален и неонатален бял дроб [124-125], цереброспинална течност [126], както и в гастро-интестинални аспирати [127-128], което предполага лесна масирана инвазия на патогена в тъканите на женския генитален тракт, както беше наблюдавано в настоящето проучване по отношение на ендометриума. Посмъртният ендометрит със септицемия и хориоамнионит, и директен ефект върху неблагоприятен изход на бременността са абсолютно доказани във връзка с *Ureaplasma parvum,* както беше наблюдавано и в настоящата научна работа [255].

Получените резултати подкрепят заключението от други клинични проучвания, че инфекцията с *Ureaplasma parvum* в плацентата и ендометриума е свързана с мъртво раждане, спонтанни аборти, преждевременно раждане и понижава нормалното тегло на новородените. Всички тези варианти, като причини на безплодие присъстват в анамнезата за репродуктивна несполука на позитивните за *Ureaplasma parvum* пробанди с инфектирани менструални тъкани. Резултатите от проучването относно високия дял на позитивни за

Ureaplasma parvum безплодни жени с анамнеза за рекурентни спонтанни аборти корелират с цитираните данни, според които този патоген се изолира по-често от пациенти с анамнеза за повтарящи се спонтанни аборти, отколкото от нормални бременни и небременни жени [256].

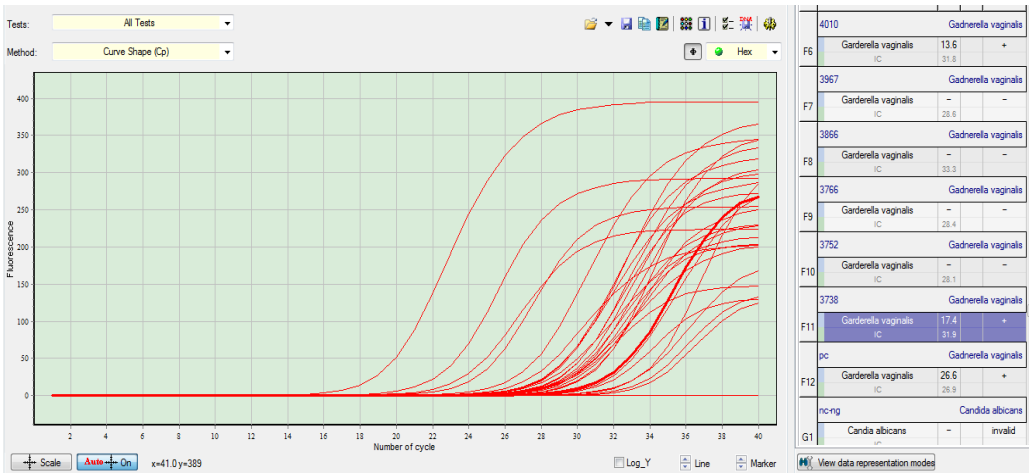
Интересен факт, е че някои от пробандите, заразени с *Ureaplasma parvum/urealyticum, Garnerella vaginalis, Mycoplasma hominis* нямат наличие на физиологични обструкции или усложнения на гениталния тракт. В тези случаи е вероятно безплодието да е функция от директно инфектиране на зиготата от заразен сперматозоид, а положителния инфекциозен ендометриален статус да е скоро настъпило събитие, което все още не е инициирало възпалителни усложнения. Настоящите наблюдения потвърждават хипотезата за бактериална инвазия, осъществена по пътя на вертикалната трансмисия, посредством фактора на инфектирана семенна течност, което е в съответствие с публикуваните данни [114].

Въпреки многократно доказаната причинно-следствена връзка на инфекцията с *Ureaplasma parvum* със сериозни репродуктивни проблеми, няма достатъчно изследвания за наличието и в проби от менструална кръв, както и изграден диагностичен навременен подход за идентифицирането и в женски ендометриум и като цяло горен генитален тракт. Сериозността на късните последици от инфекция с *Ureaplasma parvum* (хорионамнионит, преждевременно разкъсване на родилните мембрани, преждевременно раждане, фетален инфламаторен синдром, фетална смърт) правят още по-ценна възможността за неинвазивен скрининг чрез менструална тъкан.

Gardnerella vaginalis

33,8 % от тестваните пробанди в инфертилната клинична група имат позитивни резултати за инфекция с *Gardnerella vaginalis* (69,31 % от всички позитивни бактериални менструални тъкани). Наблюдаваното високо разпространение на *Gardnerella vaginalis,* докладвано в проучването потвърждава връзката между провъзпалителното състояние на ендометриума и неблагоприятния изход от бременността, като се имат предвид клиничните данни на инфектираните пациентки (предимно биохимични концепции, ранни и късни спонтанни аборти и едно мъртво раждане).

Установяването на този висок процент на инфекция с *Gardnerella vaginalis* в ендометриални тъкани (Фиг. 24) и отсъствието и в контролните влагалищни проби презентира асцендентния характер на този микроорганизъм.



Фиг. 24. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *Gardnerella vaginalis.*

Въпреки липсата на *Gardnerella vaginalis*- асоциирана бактериална вагиноза към момента на изследване на пробандите, не е изключена подобна патология в миналото. Съвсем възможно е долен генитален тракт да не показва признаци на бактериална вагиноза, но остатъчни бактерии от минал период, асоциирани със състоянието да са преминали към в ендометриума и намножили там. Бактериалната вагиноза определя 50% риск за асцендиране на инфекцията към горен генитален тракт и установяване на структуриран полимикробен биофилм от *Gardnerella vaginalis* върху ендометриума и фалопиевите тръби [257]. На практика формиращите се структурирани биофилми протектират бактериите, асоциирани с бактериална вагиноза от анимикробните лекарства, което обуславя терапевтична резистентност и персистенция.

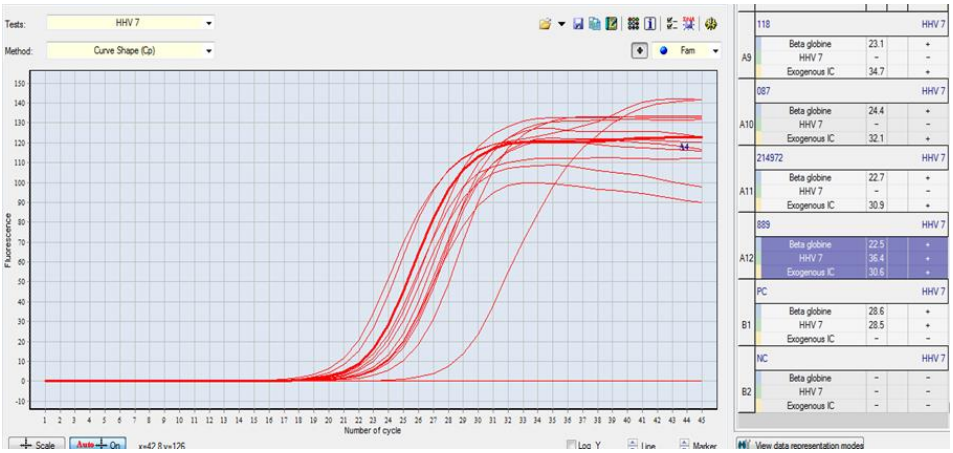
Колонизацията на ендометриума с *Gardnerella vaginalis* безспорно може да повлияе неблагоприятно на изхода на бременността, което се потвърждава в настоящата извадка безплодни жени с масово инфектирани менструални тъкани. Нашите данни подкрепят други автори, които докладват наличие на ендометриална колонизация с доминираща бактериална фракция от *Gardnerella vaginalis* и липса на положителна инфекция с други патогени, което подсказва за автономното отрицателно въздействие на *Gardnerella vaginalis* върху фертилните параметри [258].

Предвид масовата бактериална инвазия в извадката, вероятно именно ендометриалната колонизация и последваща провъзпалителна реакция и имунен дисбаланс са довели до случаи, като компрометирано забременяване, неуспешна имплантация, спонтанен аборт и преждевременно раждане в изследваните с менструални тъкани пробанди, което се съобщава и от редица други екипи [184]. По-голямата част от доказателствата подкрепят значението на бактериални продукти, като: ендотоксини, макрофаги и други продукти на Th-1 отговора (*IL-1*, *TNF* и др.) в механизмите, отговорни за неблагоприятен изход на бременността [185].

Докладваните данни за наличие на 53,48 % ко-инфекция *Gardnerella vaginalis/Ureaplasma parvum* в инфектираните менструални тъкани, но отрицателни в цервикално-вагинални секрети директно потвърждават тропизма на тези патогени към горния генитален тракт. Разбира се хипотезата за директна вертикална трансмисия към ендометриума посредством инфектирана семенна течност е приемлива.

HHV-7

В инфертилната клинична група беше детектирана позитивна инфекция с *HHV-7* в 42,5 % от случаите, като отчетената честота е най-висока от всички позитивни за човешки херпесни вируси менструални тъкани (Фиг. 25.). Изненадващите данни предполагат потенциална връзка между активната асимптоматична инфекция с *HHV-7*, като фактор или ко-фактор в женския ендометриум и сложната клинична картина на неизяснено женско безплодие.



Фиг. 25. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *HHV-7*.

Подобни проучвания са от голямо значение, тъй като *HHV-7* се оказва морфологично подобен на *HHV-6*, който е с доказан негативен ефект върху репродукцията, а вече е установено, че двата вируса участват едновременно в патогенезата на други заболявания [259].

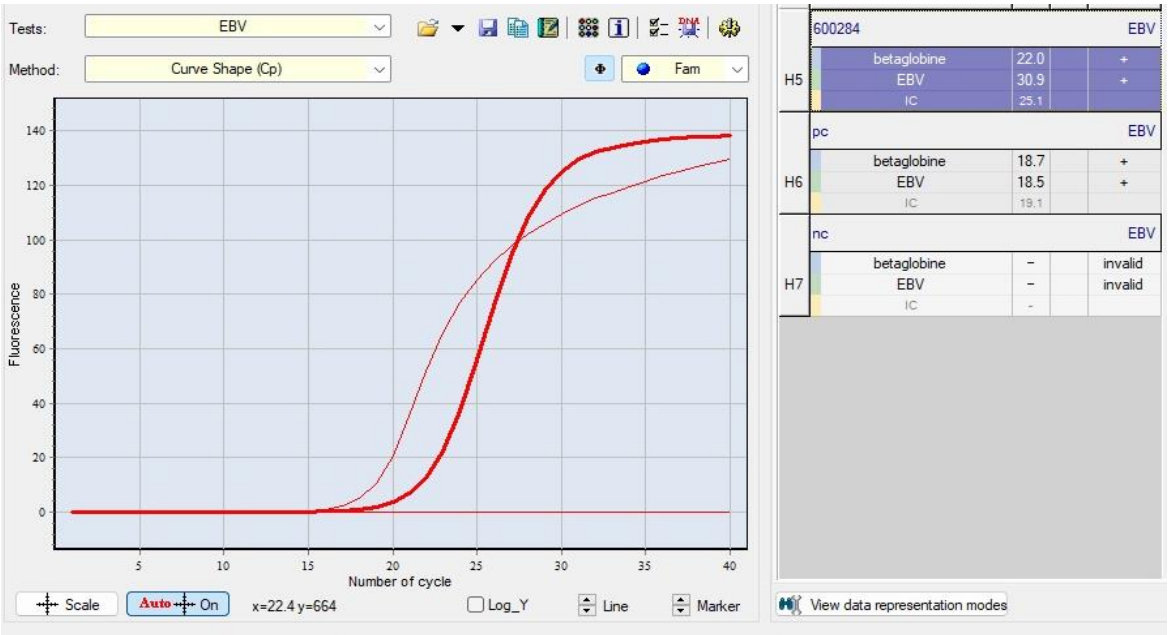
Смята се, че почти 100% от населението е заразено с *HHV-7* по време на ранна детска възраст и доказано остава в латентно състояние след това. Като единствена логична хипотеза за установената висока честота на *HHV-7* в инфектираните менструални тъкани на безплодните пробанди се приема именно претърпяна реактивация вследствие на различни хормонални и други екзо и/или ендогенни стимули. Тъй като няма данни за негативно участие на *HHV-7* върху сперматогенезата и качеството на спермалните параметри и дори изобщо не се детектира в семенна течност, хипотезата за вертикална трансмисия чрез инфектирани сперматозоиди относно *HHV-7* НЕ важи.

Данните за ролята на *HHV-7* в женското и мъжко безплодие са оскъдни, недостатъчни и епизодични. Макар, че има доказателства за субклинична виремия с *HHV-7* при безплодни жени и нищожно разпространение на вируса в цервикални секрети са

нужни разширени бъдещи проучвания за да се приеме/отхвърли и изясни връзката му с анамнеза на безплодие. При всички случаи преобладаващата активна инфекция с *HHV-7 в* 42,5 % от инфектираните менструални тъкани на български инфертилни пациентки не бива да се подценява, като потенциална или най-малкото ко-факторна предпоставка за репродуктивни несполуки.

EBV

Детектираната честота на *EBV* в инфектираните менструални тъкани е висока - 40 % (Фиг. 26.), като съвпада с публикуваните данни за разпространение на *EBV* (предимно в ендоцервикални проби) от 8,9 % в шведска извадка [223], 18-19% при италиански пациентки [224] до 38 % отново при европейски жени.



Фиг. 26. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *EBV*.

Сред многото вирусни фактори с роля в събитието загуба на бременност, се счита, че майчините инфекции, причинени от *EBV* и *CMV* са от особена важност. Предвид данни за масирани плацентарни инфекции с *EBV* 22,5 % и *CMV* 30% /доказано чрез имунохистохимия и "in situ" хибридизация/ при жени с рекурентни аборти [225], категорично не се изключва такъв вариант в настоящата извадка български жени.

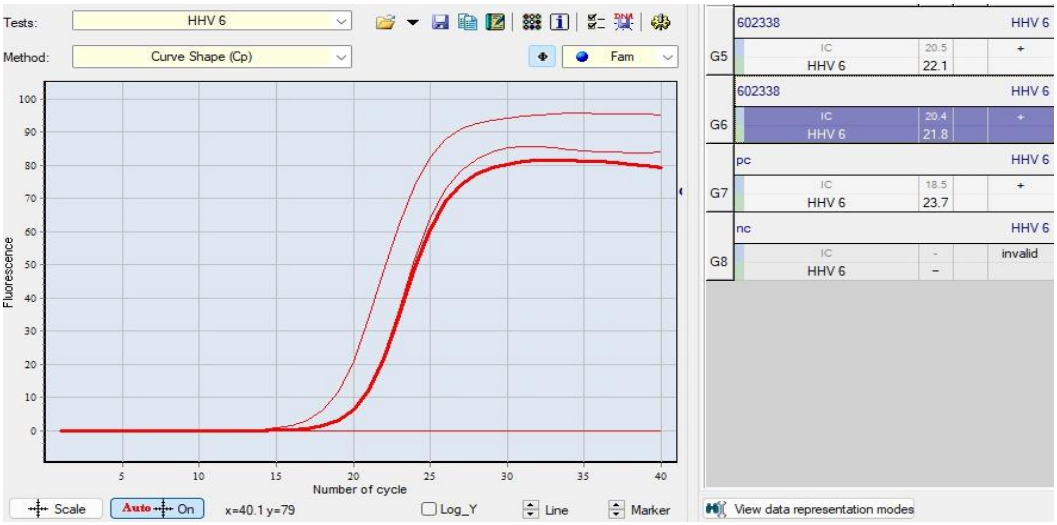
Логично е, че плацентарното инфектиране с *EBV* и *CMV* се извършва посредством маточната кухина на бременната жена, респективно ендометриум. Реално в настоящото проучване предвид високата честота на *EBV* 40 %, кореспондираща с публикуваните данни, се приема, че ендометриума на инфертилните пробанди е набогатен с патогена и вероятно има сигнификантна роля в случаите на рекурентни аборти или най-ранни такива, свързани с имунологично отхвърляне и нарушена имплантация.

Ендометриалната колонизация с *EBV* в проучването вероятно също е функция на реактивирана латентна инфекция в жената или вътрематочна трансмисия чрез инфектирани

сперматозоиди. Позитивните находки на *EBV* ДНК в семенна течност на инфертилни мъже докладвани от различни изследватели в 0,4% , 16,8%, 40,6% и асоциацията с левкоцитоспермия отново подкрепя възможната вертикалната трансмисия чрез партньора [229-230, 260]. Независимо от механизма на *EBV* трансмисия към горен женски генитален тракт, попаднал там вирусът би могъл да се реактивира и намножи сигнификантно под действие на различни стимули, отключвайки каскада от събития, свързани с репродуктивни несполуки.

HHV-6

Детектираната честота на *HHV-6* в 10% от менструалните тъкани на пробандите в инфертилната клинична група е значително по-ниска от докладваната в литературата (40 %) при жени с идиопатично безплодие (Фиг. 27.).



Фиг. 27. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *HHV-6*.

Счита се, че именно *HHV-6* инфекцията на ендометриалните епителни клетки, която доказано нарушава децидуализацията [238] е свързана с някои от случаите на спонтанни аборти в настоящата извадка пробанди, позитивни за *HHV-6*. Вирусното действие вероятно понижава експресията на маркери за децидуализация, например *HLA-G23* и *MUC1*, които участват в: диференциацията на ендотелните клетки, имплантацията, ангиогенезата, клетъчния растеж на трофобласти и имунната регулация по време на ранна бременност, както се докладва [238, 240].

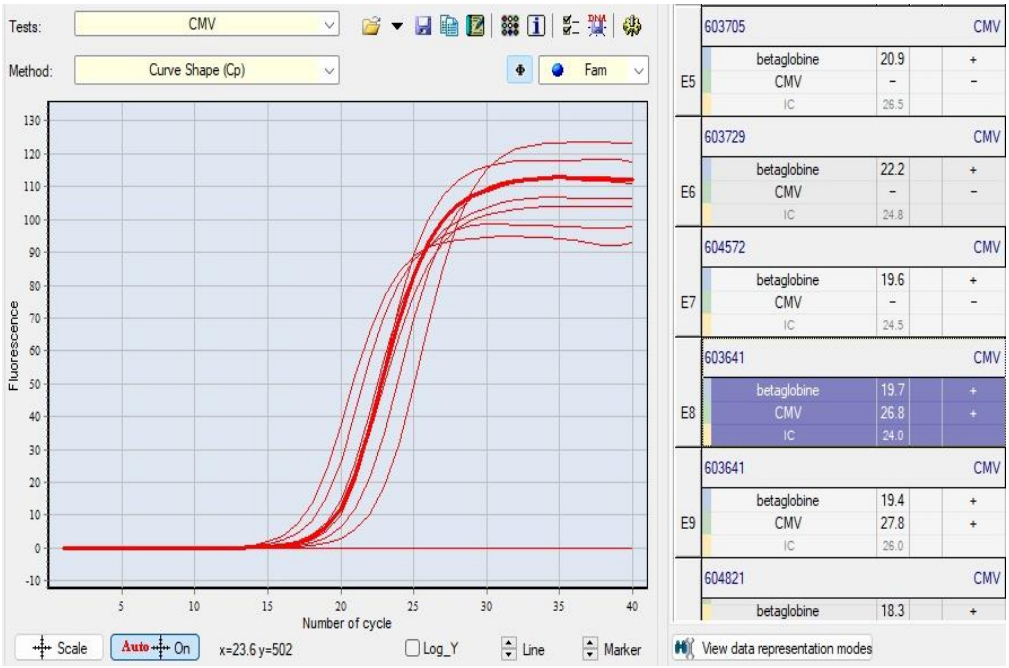
Въпреки липсата на влияние на *HHV-6* върху спермалните параметри, високия процент на разпространение 70% при мъже с нормална спермограма и 66,3% при мъже с отклонения в качеството на спермалните показатели [261] подсказва възможна

вертикалната трансмисия чрез партньора, като главен начин за заразяване на женски ендометриум [262] и в настоящата разработка.

По-ниската честота, детектирана в настоящето проучване, вероятно се дължи на неизследвания популационен индекс на мъжко спермално носителство на вируса, което както бе споменато е основен трансмисивен резервоар на инфекцията.

CMV

Детектираната в инфектирани менструални тъкани честота на *CMV* 7,5 % кореспондира с докладваната 11, 5 % в цервикални проби и плацентарни тъкани (Фиг. 28.) [225].



Фиг. 28. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *CMV*

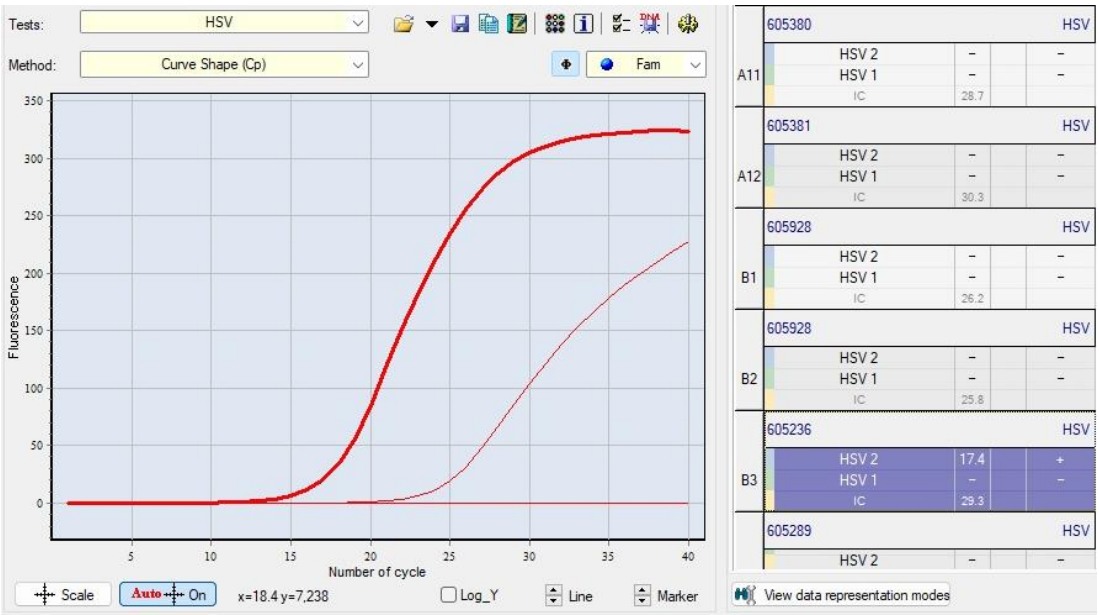
Както беше посочено *CMV* доказано набогатява женски ендометриум, след което и плацентата по време на бременност, реплицирайки се успешно в трофобластни, епителни, стромални клетки и макрофаги, както и фетални тъкани. В случаите на инфектиран с *CMV* ендометриум се стига до масирано разпространение на вирусната инвазия към изброените отдели и спонтанна загуба на бременност в резултат на предизвикания възпалителен отговор, което може да е причина за неблагоприятен изход и в анализираната група [217].

Освен механизъм на цервикално реактивиране и асцендиране на инфекцията към ендометриум, и в този случай алтернативен вариант за ендометриална *CMV* колонизация е чрез заразена семенна течност [263-264]. Теорията се подкрепя и чрез индиректни данни за по-висока честота на *CMV*, детектирана в семенната течност на партньорите на пациентки с история на рекурентни спонтанни аборти спрямо контролната група ($p<0,05\%$) [265]. Вирусът оказва директен гаметотоксичен ефект върху незрелите примордиални мъжки полови клетки. Теоретично не е изключено по пътя на вертикална трансмисия именно такъв

некачествен дефектирал сперматозоид да извърши опложданe въпреки защитите и селективността на женската яйцеклетка и полова система. Разбира се логично подобен вариант би завършил отново със загуба на бременност каквито случаи се доказват за женските пробанди в проучването, заразени с *CMV* (предимно ранни аборти в преембрионален и ембрионален стадий).

HSV1/2

В изследваната клинична група пробанди *HSV1/2* беше детектиран с минимална честота 2,5 % (Фиг. 29). В изследваната клинична група позитивните за *HSV1/2* пациентки имат анамнеза за наличие на ранни спонтанни аборти.



Фиг. 29. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна ифекция с *HSV2*

Получените резултати не съвпадат с публикуваните данни за наличие на ДНК от *HSV1/2* в менструална тъкан при 55% жени и при 24% мъже с безплодие и неуспешни IVF процедури (p = 0,0086) [203].

Счита се , че реактивацията на *HSV1/2* в ендометриум предизвиква повишаване активността на NK клетките, предизвиквайки *Th1/Th2* цитокинов дисбаланс, тромбогенен ефект, апоптоза в децидуални и трофобластни тъкани, което рефлектира в загуба на бременност [206 -208]. Директния негативен ефект на *HSV* върху морфологията и моталитета на сперматозоидите при мъже засяга отново тезата за директно инфектиране на новообразуваната зигота от засегнат сперматозоид, което се асоциира с последваща загуба на бременност [197].

Високата литературна честота на ендометриалните инфекции с *HSV1/2* и връзката му със загуба на бременност през първия триместър дават гласност за необходимостта от детекцията му чрез използване на прецизни и чувствителни молекулярни техники.

Ко-инфекция

Резултатите в разработката показват, че най-честите варианти на ко-инфекция са следните: *Ureaplasma parvum/Gardnerella vaginalis* – 53,48 %; *HHV-7*/ *Gardnerella vaginalis* - 11,62 %, *EBV*/ *Ureaplasma parvum* - 11,62 % (Фиг. 21.). Предполага се, че всички варианти на съпътстващи инфекции, дори редки, оказват влияние върху комплексната причина за репродуктивна несполука. Най-вероятният патологичен механизъм включва провокиране на допълнителна уязвимост на ендометриума, разрушаване на локалния баланс и имунитет, възпалителни промени в тъканите на горния генитален тракт.

4.6. Определяне на видово-специфична честотота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*) в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролната инфертилна група/.

Контролната група, съставена от инфертилни жени, тествани за таргетния инфекциозен панел върху биологичен материал ендометриална биопсия се състои от общо 65 пациентки на възраст (22-49г.). Инфертилните пробанди бяха селектирани главно въз основа на тяхната история на ранни и/или късни повтарящи се аборти, липса на автоимунни или придружаващи заболявания, асоциирани с репродуктивни проблеми. Негативният статус по отношение на целевия бактериално/вирусен панел в цервикално-вагиналните тампони беше водещият критерий за избор на пациентите и в тази група, както и в предходната, разгледана в т. 4.5.

Целта на така подбраната контролна група е да оцени взаимозаменяемостта на инвазивната ендометриална биопсия с неинвазивно придобита проба - менструална тъкан.

Всички ендометриални биопсии от инфертилни български жени бяха тествани за базовия бактериално-вирусен таргетен панел (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*). При анализа на контролната група инфертилни жени, не беше ползвана здрава контролна група поради инвазивния характер на пробовземане на този тип биологична проба.

Бактериите *Gardnerella vaginalis* и *Ureaplasma parvum* бяха открити в 31,25% и 3,12% от всички бактериално инфектирани ендометриални биопсии.

Активна инфекция с *EBV, CMV, HHV-6* и *HHV-7* се детектира съответно в 30%, 30%, 20% и 20% от всички инфектирани с вирусни фактори ендометриални биопсии на инфертилни пациентки (Таблица 14.).

Инфекции с останалите таргетни патогени не бяха детектирани в ендометриалните биопсии, а именно: *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycomplasma hominis/genitalium, HSV1/2, VZV* и *HHV-8*.

Таблица 14. Позитивни инфекциозни фактори и варианти на ко-инфекция в контролната инфертилна група пробанди, тествани чрез ендометриална биопсия.

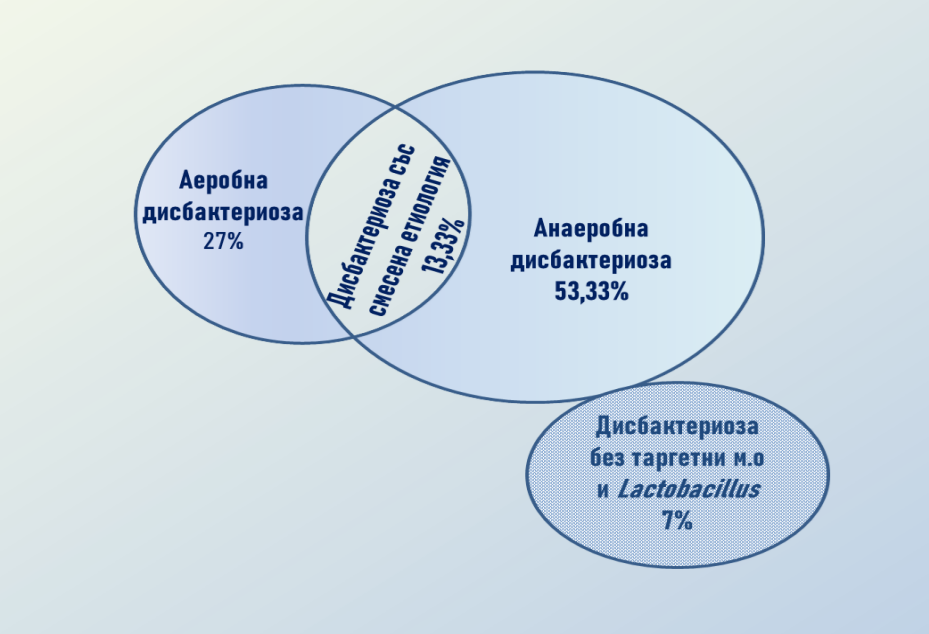
Инфекциозен фактор	Честота	Вирусно-бактериални варианти на ко-инфекция
EBV*	**30%**	---
CMV*	**30%**	• *CMV* + умерено изявена аеробна дисбактериоза и доминираща бактериална фракция: *Streptococcus spp.*
		• *CMV* + дисбактериоза със смесена етиология: *Lachnobacterium spp.* + *Clostridium spp., Enterobacteriaceae* and *Streptococcus spp.*
HHV-6*	**20%**	• *HHV-6* + силно изявена анаеробна дисбактериоза с доминираща бактериална фракция: *Eubacterium spp.*
HHV-7*	**20%**	---
Gardnerella vaginalis*	***31,25%***	• ***Gardnerella vaginalis (доминираща) + анаеробна дисбактериоза: Prevotella bivia, Porphyromonas spp.***
		Gardnerella vaginalis (доминираща) + анаеробна дисбактериоза: Mobiluncus spp., Corynebacterium spp., Eubacterium, Atopobium vaginae
		Gardnerella vaginalis (доминираща) + аеробна дисбактериоза: Staphylococcus spp., Enterobacteriaceae spp.
Ureaplasma parvum*	***3,12%***	---

***След приложена индивидуална терапия (1,5-3 месеца) се наблюдава изцяло бактериално и/или вирусно изчистване на горен генитален тракт. Отново беше извършен ретест върху ендометриални биопсии с цел терапевтично проследяване.**

4.7. Определяне статус на ендометриален микробиом в ендометриална биопсия от инфертилни жени /контролна инфертилна група/.

Освен за прицелния бактериално-вирусен панел (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*), ендометриалните биопсии бяха тествани също за анаеробни и аеробни бактериални микроорганизми, част от които опортюнистични, както и коменсална фракция микроорганизми с цел проверка на ендометриалния баланс. **По този начин се определи честотата на инфекция/ко-инфекция с анаеробни и аеробни микроорганизми, причиняващи дисбактериоза и ендометриална бактериална колонизация в контролната инфертилна група.**

Състояние на анаеробна и аеробна дисбактериоза беше открито съответно при 53,33% и 27% във всички ендометриални проби. Наличие на дисбактериоза със смесена етиология беше идентифицирана при 13,33%, докато при 7% е установено дисбиотично състояние без прицелните бактерии и при пълна липса на коменсалната фракция микроорганизми от *p. Lactobacillus* (Фиг. 30.).



Фиг. 30. Типове дисбактериоза, като следствие от небалансиран бактериален растеж, ендометриална колонизация и последващо възпаление.

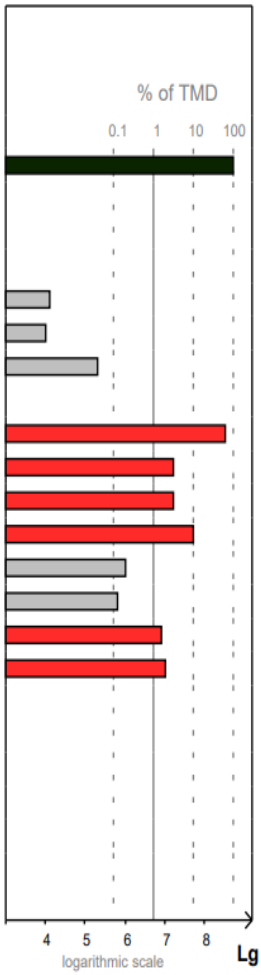
- **Анаеробна дисбактериоза** /положителни бактериални находки/: *Mobiluncus spp., Corynebacterium spp. Eubacterium spp., Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp. Eubacterium spp. ,Gardnerella vaginalis, Prevotella bivia, Porphyromonas spp., Peptostreptococcus spp., Atopobium vaginae, Lachnobacterium spp., Clostridium spp.*
- **Аеробна дисбактериоза** /положителни бактериални находки/: *Streptococcus spp., Enterobacteriaceae spp., Staphylococcus spp.*

•

Данните от настоящия дисертационен труд за детектираните анаеробни и аеробни бактерии в ендометриалните биопсии корелират с резултатите от високотехнологични изследвания върху ендометриалния микробиом [48; 52]. Най-разпространеният вариант на *Gardnerella vaginalis* доминираща анаеробна дисбактериоза е в комбинация с *Prevotella bivia, Porphyromonas spp.* и вторият с *Mobiluncus spp., Corynebacterium spp., Eubacterium* и *Atopobium vaginae* (Фиг 31.). *Staphylococcus spp.* и *Enterobacteriaceae spp.* се открива предимно в случаите на аеробна дисбактериоза (Фиг 32.).

Sample ID: 604928

№	Test title	Result	
		Quantitative	Relative Lg(X/TMD)
	Sample intake control	$10^{5.9}$	
1	Total Bacterial Mass	$10^{8.7}$	
	Normal microflora		
2	Lactobacillus	not detected	
	Facultative anaerobic microorganisms		
3	Enterobacteriaceae	$10^{4.1}$	-4.5 (<0.1%)
4	Streptococcus spp.	$10^{4.0}$	-4.6 (<0.1%)
5	Staphylococcus spp.	$10^{5.3}$	-3.3 (<0.1%)
	Obligate anaerobic microorganisms		
6	Gardnerella vaginalis+Prevotella bivia+Porphyromonas spp.	$10^{8.5}$	-0.1 (64-87%)
7	Eubacterium spp.	$10^{7.2}$	-1.4 (3- 4%)
8	Sneathia spp.+Leptotrichia spp.+Fusobacterium spp.	$10^{7.2}$	-1.4 (3- 4%)
9	Megasphaera spp.+Veillonella spp.+Dialister spp.	$10^{7.7}$	-0.9 (10-14%)
10	Lachnobacterium spp.+Clostridium spp.	$10^{6.0}$	-2.6 (0.2-0.3%)
11	Mobiluncus spp.+Corynebacterium spp.	$10^{5.8}$	-2.8 (0.1-0.2%)
12	Peptostreptococcus spp.	$10^{6.9}$	-1.7 (1.6-2.2%)
13	Atopobium vaginae	$10^{7.0}$	-1.6 (2.0-2.8%)
	Yeast-like fungi		
14	Candida spp. *	not detected	
	Mycoplasmas		
15	Mycoplasma hominis *	not detected	
16	Ureaplasma (urealyticum + parvum) *	not detected	
	Pathogenic microorganisms		
17	Mycoplasma genitalium **	not detected	



* Quantitative Analysis Lg(X) ** Qualitative Analysis *** Below threshold

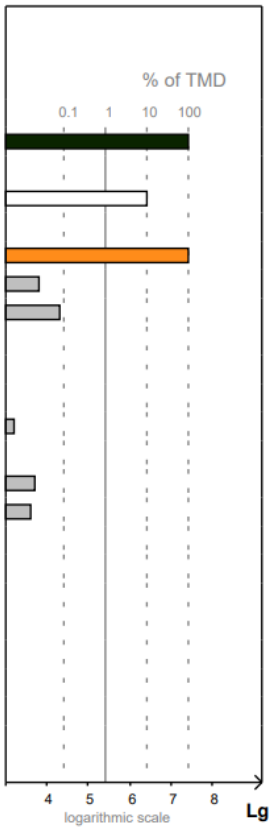
Conclusion:

Apparent Anaerobic dysbiosis

Фиг. 31. Анаеробна дисбактериоза с доминираща бактерия *Gardnerella vaginalis* в комбинация с *Prevotella bivia, Porphyromonas spp.* Тотална липса на коменсална фракция: *Lactobacillus.*

Sample ID: 609877

№	Test title	Result	
		Quantitative	Relative Lg(X/TMD)
	Sample intake control	$10^{6.3}$ ☐	
1	Total Bacterial Mass	$10^{7.4}$ ☐	
	Normal microflora		
2	Lactobacillus	$10^{6.4}$	-1.0 (8-10%) ■
	Facultative anaerobic microorganisms		
3	Enterobacteriaceae	$10^{7.4}$	0.0 (77-100%) ■
4	Streptococcus spp.	$10^{3.8}$	-3.6 (<0.1%) ☐
5	Staphylococcus spp.	$10^{4.3}$	-3.1 (<0.1%) ☐
	Obligate anaerobic microorganisms		
6	Gardnerella vaginalis+Prevotella bivia+Porphyromonas spp.	not detected	☐
7	Eubacterium spp.	not detected	☐
8	Sneathia spp.+Leptotrichia spp.+Fusobacterium spp.	$10^{3.2}$	-4.2 (<0.1%) ☐
9	Megasphaera spp.+Veillonella spp.+Dialister spp.	not detected	☐
10	Lachnobacterium spp.+Clostridium spp.	$10^{3.7}$	-3.7 (<0.1%) ☐
11	Mobiluncus spp.+Corynebacterium spp.	$10^{3.6}$	-3.8 (<0.1%) ☐
12	Peptostreptococcus spp.	not detected	☐
13	Atopobium vaginae	not detected	☐
	Yeast-like fungi		
14	Candida spp. *	not detected ☐	
	Mycoplasmas		
15	Mycoplasma hominis *	not detected ☐	
16	Ureaplasma (urealyticum + parvum) *	not detected ☐	
	Pathogenic microorganisms		
17	Mycoplasma genitalium **	not detected ☐	



* Quantitative Analysis Lg(X) ** Qualitative Analysis *** Below threshold

Conclusion:

Apparent Aerobic dysbiosis

Фиг. 32. Аеробна дисбактериоза с доминираща инфекция с *Enterobacteriaceae*. Драстично редуцирана коменсална фракция: *Lactobacillus* (8-10%).

Като обща характеристика на дисбиотичните състояния се приема намаляващия дял на р. *Lactobacillus* в различна степен, както се съобщава и в литературата [54]. Някои научни групи работещи върху бактериални взаимодействия (мрежи) доказват, че р. *Lactobacillus*, обединяващ коменсални микроорганизми е отрицателно свързан с *Gardnerella*, *Bifidobacterium* и *Atopobium* [52], както беше наблюдавано и по отношение на *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* в текущото проучване.

Драстичната редукция или тотална липса на *Lactobacillus spp.*, което се докладва в разработката, създава благоприятна предпоставка за: неконтролиран растеж на остатъчни бактериални фракции от минала инфекция, прекомерен растеж на опортюнистични бактерии, както и повишена уязвимост на ендометриума към ново заразяване, провъзпалителен отговор и имунен дисбаланс. Тази каскада от събития предполага ролята на ендометриалния микробиом за успешна имплантация и протичане на бременността, което обуславя необходимостта от ендометриално микробиомно изследване на всички жени с репродуктивни трудности.

Заслужава си да бъде отбелязано, че пробите от долен генитален тракт (цервикално-вагинални секрети) в изследваната контролна инфертилна група показаха нормоценоза и

конвенционална нормоценоза, но в ендометриума беше детектирана умерена и силно изявена дисбактериоза, както и варианти на полимикробиална ко-инфекция. Последното акцентира върху важността от извършване на микробиомното изследване върху ендометриална проба (менструална тъкан или биопсия).

4.8. Сравнителен анализ на данните от клинична и контролна инфертилна група относно приложението на таргетния вирусно-бактериален панел върху биологичен материал менструална тъкан и ендометриална биопсия.

В контролната инфертилна група 35,47 % от изследваните пациенти демонстрираха отрицателен инфекциозен статус, което кореспондира с резултатите от менструална тъкан (38,9 %). 64,53% от всички изследвани ендометриални биопсии бяха детектирани с положителен инфекциозен статус (49,23% бактериални и 15,3% вирусни патогени). Получените данни отново корелират с установените 61,1 % положителни за инфекции менструални проби на инфертилната клинична група (48,8 % бактериални и 22,2% вирусни патогени). Поразително е, че процентът на съвпадение в установената честота на инфекция при клиничната и контролна група запазва своето разпределение и по отношение на вирусна и бактерилна компонента.

Високата съпоставимост на данните относно инфекциозен бактериално/вирусен статус в клиничната и контролна инфертилни групи категорично демонстрира репрезентативността на неинвазивната менструална тъкан, като представителна проба за горен женски генитален тракт и потвърждава възможността същата да бъде използвана вместо инвазивна ендометриална биопсия.

Докладваният в проучването отрицателен инфекциозен статус при 100% от изследваните здрави контроли, ясно сочи за негативно влияние на таргетния инфекциозен панел върху безплодието при жени (Таблица 15.).

Таблица 15. Обща честота на инфекция за таргетния вирусно-бактериален панел .

Клинична група	Отрицателен инфекциозен статус	Положителен инфекциозен статус
Инфертилна (180)	**38,9%**	**61,1% (48,8% бактериални и 22,2% вирусни)**
Контролна (90)	**35,47 %**	**0%**

Инфертилна с ендометриална биопсия (65)	**35,47%**	**64,53% (49,23 бактериални и 15,3% вирусни)**

По-ниската честота на позитивна инфекция с ***Gardnerella vaginalis*** в ендометриалните биопсии 31,25% в сравнение с менструалната тъкан 69,31% се счита за нормална находка, предвид големина и разнородност на извадката. Групата с ендометриалните биопсии (65) се приема за относително малка в сравнение с броя на изследваните проби от менструална тъкан (180). Също, ендометриалните биопсии имат положителна анамнеза единствено за повтарящи се аборти, докато селекцията на проби от менструална тъкан включва голямо разнообразие от репродуктивни и асоциирани с безплодие здравословни проблеми. Предполагаме, че с увеличаване на брой и разнородност на извадката пробанди, тествани с ендометриална биопсия, статистиката ще се промени.

Друга съществена потенциална причина за наблюдаваните разлики е, че при контролната инфертилна група, изследвана с ендометриална биопсия ~ 50% от половите партньори на селектираните пациентки са тествани и са негативни относно прицелните бактериални патогени чрез микробиологично култивиране (данните не са представени).

Както беше упоменато ~1/2 от случаите на доминираща активна инфекция с *Gardnerella vaginalis* в изследваните ендометриални биопсии са представени във вариант на ко-инфекция с други предимно анаеробни бактерии и по-рядко със смесено присъствие на анаеробни и аеробни бактерии. Тази особеност естествено важи единствено за контролната инфертилна група, тествана с ендометриални биопсии, тъй като само върху тях е приложена допълнителна диагностика на анаеробни, аеробни и коменсални бактериални микроорганизми с цел проверка на ендометриалния баланс.

Ureaplasma parvum беше детектирана само в 3,12% от всички бактериално инфектирани ендометриални биопсии, което е изключително нисък процент спрямо данните от менструална тъкан – 61,36%. Получените резултати в контролната група, тествана с ендометриални биопсии не потвърждават литературните данни, според които инфекцията с *Ureaplasma parvum* е свързана с повтарящи се спонтанни аборти [256].

Възможни обяснения за ниската честота на *Ureaplasma parvum* в контролната група са сходни с интерпретацията на данните относно *Gardnerella vaginalis*: негативен статус в цервикално-вагиналните секрети, негативен статус за батериалните патогени в ~ 50% от половите партньори на пробандите в извадката, обем и анамнеза на извадката, както и много строги критерии за включване в изследването

Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis/genitalium* и *Ureaplasma urealyticum не бяха открити в ендометриалните биопсии, което не потвърждава литературните данни [266]. От друга страна *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* бяха открити също с много ниска честота (2,27%) в менструални тъкани. *Mycoplasma hominis/genitalium* се

съобщава с пренебрежимо ниска честота (2,9%) в някои изследвания, което корелира с цитираните резултати в настоящата научна работа [153]. Реално и в двете клинични групи тези патогени липсват или са детектирани в минимален процент. Предполага се, че отчетените резултати са функция на селективен избор на пробанди с отрицателен цервико-вагинален статус и история на терапия за тазово-възпалителни състояния.

Активна инфекция с ***EBV, CMV, HHV-6*** **и** ***HHV-7*** беше открита в 30%, 30%, 20% и 20% от позитивните за вирусни фактори ендометриални биопсии и в 40%, 7,5%, 10% и 42 ,5% от менструалните тъкани (Таблица 16.). Предполага се, че тези разлики се дължат на по-малкия брой изследвани ендометриални биопсии (65) в сравнение с менструалните тъкани (180). Ако ендометриалните биопсии се увеличат с времето, не е изключено да получим по-сходни резултати в двете клинични групи. Възможно е обаче и да се запазят устойчиво разликите и тенденцията за по-висока честота на *CMV, HHV-6* в групата на ендометриалните биопсии и по-висока честота за бактериалните патогени и *EBV, HHV-7* в инфектираните менструални тъкани. Важен дивергентен критерий се явява анамнезата на пробандите.

Таблица 16. Сравнителен анализ от приложението на прицелния инфекциозен панел в клинична и контролна инфертилна група

Положителни патогени	Менструална тъкан	Ендометриална биопсия	Коментари
CMV	**7,5%**	**30%**	**Разнородност на извадка Анамнеза**
EBV	**40%**	**30%**	**Разнородност на извадка Анамнеза**
HHV-6	**10%**	**20%**	**Разнородност на извадка Анамнеза**
HHV-7	**42,5%**	**20%**	**Разнородност на извадка Анамнеза**
Ureaplasma parvum	**61,36%**	**3,12%**	**Разлика в извадка Негативен вагинален статус Негативен партньор**

Gardnerella vaginalis	**69,31%**	**31,25%**	**Разлика в извадка** **Негативен вагинален статус** **Негативен партньор**

Клиничната инфертилна група е с разнородна анамнеза, докато контролната се състои само от жени със спонтанни аборти. Наблюдаваните от нас резултати хипотезират различна степен на асоциативност на определени инфекции с конкретни репродуктивни разстройства. Така например, много по-високият процент на *CMV* в ендометриални биопсии (40%) спрямо детектирания 7,5% в положителни менструални тъкани подсказва като хипотеза, че *CMV* се асоциира основно със спонтанни аборти и по-рядко с други репродуктивни несполуки. Обратно, по-високият процент на *HHV-7* в менструални тъкани 42,5% в сравнение с детектирания в ендометриални биопсии 20%, говори за по-вероятна връзка с проблемна концепция, отколкото с аборт. Разбира се има необходимост от разширени проучвания в перспктива в подкрепа на констатираните тенденции, асоциации и мултифакторни констелации.

В допълнение, 50% от половите партньори в извадката инфертилни пробанди, тествани с ендометриални биопсии са скринирани за бактериалните патогени от обхвата на прицелния панел, но не и за вирусите. Това респективно създава допълнителна предпоставка за вирусна трансмисия към горен генитален тракт. Вероятно допринася също и за по-високата честота на *CMV, HHV-6* спрямо установения бактериален профил в тази клинична група.

Вирусните патогени ***HSV1/2, VZV*** **и** ***HHV-8*** не бяха открити в изследваните ендометриални биопсии, докато в пробите от менструална тъкан на инфектираните безплодни пробанди беше регистрирано наличие само на *HSV2* с много ниска честота (2,5%). Описаните резултати кореспондират с литературни данни за ниска честота на *HSV1/2* инфекция (1,4%-1,7%) и тотална липса на позитивни находки за *VZV* в ендоцервикални секрети на асимптомни пациентки [267]. В същото време *HSV1/2* се детектират в много по-висок процент 55% в менструални тъкани на безплодни жени, което противоречи на настоящите резултати [203]. Трябва да се отчете и факта, че в цитираното пилотно изследване на El Borai и екип върху менструална тъкан, повечето установени честоти на разпространение на патогените са завишени. Поради оскъдни данни в литературата върху този вид биологичен материал, цитираните в настоящата дисертация резултати по заложените селективни критерии, дават яснота за асоциация/липса на асоциация на прицелните патогени с конкретни репродуктивни проблеми.

Напълно негативния статус по отношение на *VZV* и *HHV-8* не е изненада, тъй като докладваната им честота за женски генитален тракт очевидно е много ниска или липсваща, въпреки възможността за колонизация на горен генитален тракт и връзката на двата патогена със спонтанни аборти и перинатална инфекция. Логично е да липсват и в двете

клинични групи, защото разпространението им е географски и културално стратифицирано. В този смисъл е напълно нормално при съвременни български европейски жени с достъп до ваксини и превенция да липсват. В настоящото проучване изключваме дори възможността за вертикална трансмисия на *VZV* и *HHV-8* посредством инфектирана семенна течност, въпреки, че *VZV* в семенна течност на инфертилни мъже се докладва с честота ~3,2 % и има негативен ефект върху сперматогенезата, докато *HHV-8* няма роля за негативни флуктуации в спермалните параметри.

Съществен момент от проучването е факта, че 15% от пациентките бяха изследвани както чрез менструална кръв, така и чрез проби от ендометриална биопсия. Наблюдаваните отрицателни или положителни бактериално-вирусни находки бяха абсолютно идентични и в двата типа проби.

Докладваните данни за 100% съпоставимост на молекулярно-инфектологичните резултати в споделената извадка пациенти, тествани с двата типа биологични проби са впечатляващи. Още веднъж категорично се потвърждава, че неинвазивната менструална тъкан, съдържаща части от функционалния ендометриум, е представителна за оценка на инфекциозния статус в горен генитален тракт.

Беше приложена индивидуализирана терапия (1,5-3 месеца) към всички пациентки с бактериална/вирусна инфекция, тествани чрез ендометриална биопсия. Наблюдавахме пълно бактериално и вирусно изчистване на горен генитален тракт чрез повторно тестване на нови ендометриални биопсии.

Изненадващо най-удовлетворяващи за настоящото проучване се оказват не обещаващите молекулярно-инфектологични данни, подкрепящи или не определени репродуктивно-вирулентни механизми или честоти на разпространение на прицелните инфекциозни фактори. Най-вдъхновяващият резултат в разработката е, че при 97% от пациентите подложени на адекватна и правилна терапия, е постигната естествена концепция. В останалите 3% от случаите бяха открити от медицинските ни колаборатори находки за ендометриален полип от хиперпластичен тип. При тези пациенти лечението продължава в правилната посока.

Подобна статистика не е възможно да бъде цитирана в цялост за клиничната група инфертилни пробанди, тествани с менструална тъкан (180), поради големия и обем и разнородност на анамнезата за репродуктивна несполука, както и мотивацията за включване в проучването. Въпреки това, на база всички получени данни беше изготвен алгоритъм за диагностика и динамично проследяване на бактериално-вирусни инфекции в ендометриум и мониторинг на ефекта от проведена индивидуализирана терапия. Обещаващите данни и безспорната медико-практическа полза на проучването представлява същинския коефициент на полезно действие за жените, страдащи от неизяснено безплодие.

4.9. Обобщение и интерпретация на клиничните и молекулно-инфектологични резултати от настоящата разработка.

Различни механизми обясняват как промените в интраутеринните бактериални и вирусни фракции могат да предизвикат безплодие и неблагоприятни гинекологични състояния.

Най-вероятните механизми за набогатяване на женския горен генитален тракт (ендометриум) под формата на активна безсимптомна инфекция с прицелните бактерии и/или вируси са асцендиране на инфекция от долен генитален тракт, ендометриална реактивация на латентна инфекция или чрез вертикална трансмисия посредством половия партньор, който би могъл да бъде клинично значимо инфектиран или в роля на латентно носителство.

Различни бактериални съобщества, съставящи **ендометриалния микробиом** са в състояние да се намножат и придобият вирулентни свойства чрез механизми като разграждане на муцин, формиране на биофилм и антимикробна резистентност, което води до състояние на дисбиоза [57]. Дисбалансът в бактериалните фракции от своя страна може да повлияе на вътрематочния метаболитен състав, обуславящ завишена имунологична реактивност [58]. Възпалителните реакции срещу бактериални промени в ендометриалния микробиом се свързват с инфертилитет и персистират в изява на гинекологични заболявания. Най-вероятно подобен сценарий се е разиграл при част от инфертилните пробанди в проучването. Много важна характеристика на ендометриалната дисбиоза е, че благоприятства трансмисията на цервикално локализирани патогенни бактерии към ендометриалната дисбалансирана и нерегулирана микросреда.

Инфектирането на маточната кухина с **бактериални представители**, нехарактерни за ендометриалния тракт и широкото разпространение на полово предаваните инфекции, замесени в състоянието инфертилитет при жени, остава сериозен здравен проблем. Инфекцията на горния генитален тракт е свързана с възпаление на органите, каквито бяха докладвани в разработката и дори развитие на гнойни огнища. Тези усложнения застрашават репродуктивните способности на жената, като се асоциират с вторичен инфертилитет. Освен инфектирането на горен генитален тракт и последващите възпалителни усложнения, водещи до нарушена възможност за зачеване, други вирулентни механизми засягат процесите на имунологична толерантност в имплантационния сайт, децидуализация на ендометриалните клетки и трофобластна инвазия, пряко свързани с успешната имплантация и спонтанни аборти. Опасността от неонатални инфекции също е основен белег на инфектиран ендометриум.

Всичко това демонстрира нуждата от бактериална диагностика на женски горен генитален тракт, като задължителен аспект за избягване на описаното потенциално неблагоприятно развитие, регистрирано и в настоящата научна разработка.

Вирусната реактивация в ендометриум, както беше упоменато предизвиква повишаване активността на NK клетките, *Th1/Th2* цитокинов дисбаланс, тромбогенен ефект, апоптоза в

децидуални и трофобластни тъкани, рефлектиращи в загуба на бременност при пробанди с анамнеза на ранни спонтанни аборти [206 -207]. Този механизъм важи за всички членове на *HHVs*. Вирусните инфекции, подобно на бактериалните също имат висока застъпеност сред неонаталните усложнения и смъртност. Както беше отбелязано вирусната реактивация в ендометриума на инфертилните пробанди в проучването се счита за най-вероятен механизъм, обуславящ загуба на бременност и репродуктивна несполука при позитивните за HHVs случаи.

Обект на молекулярно-инфектологични изследвания в настоящия дисертационен труд бяха 335 жени с български произход, изследвани за следния бактериално-вирусен панел (*Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum/ parvum, Mycomplasma hominis/genitalium, Gardnerella vaginalis, HSV1/2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, HHV-8*). Тестваните жени бяха разпределени в три клинични групи спрямо вида биологичен материал и анамнеза за репродуктивна несполука: инфертилна; контролна инфертилна и контролна здрава група.

В 61,1 % от инфертилната група от 180 безплодни жени, тествани с менструална тъкан, беше детектиран позитивен инфекциозен статус за прицелния бактериално-вирусен панел. В 48,8 % от всички изследвани проби открихме бактериална инфекция, докато 22,2 % от пробите бяха позитивни за вирусни инфекциозни фактори.

Контролната инфертилна група, представена от 65 пациентки с ендометриална биопсия, демонстрира позитивен инфекциозен статус в 64,53%, от които 49,23% с бактериална и 15,3% с вирусна инфекция. Контролната инфертилна група пробанди, тествана с ендометриална биопсия беше подложена на допълнителен анализ за състояние на ендометриалния микробиом.

Здравата контролна група, състояща се от менструално-тъканни проби на 90 жени без репродуктивен неуспех или заболявания, асоциирани с безплодие, се оказа 100 % негативна по отношение на целевия диагностичен панел.

Наблюдаваните сходни проценти на положителни за инфекции пациенти в инфертилната група (61,1%), изследвани с менструална тъкан и (64,53 %) в контролната инфертилна група, изследвани с ендометриална биопсия, демонстрират репрезентативността на неинвазивната менструалната тъкан като представителна проба за горен женски генитален тракт и потвърждават възможността същата да бъде използвана вместо инвазивна ендометриална биопсия.

Докладваният отрицателен инфекциозен статус при 100% от изследваните здрави контроли, ясно сочи за негативно влияние на таргетния инфекциозен панел върху безплодието при жени.

Характерно за всички клинични групи е отрицателният цервико-вагинален статус за прицелния бактериално-вирусен панел. Този критерий бе умишлено включен в изследването, за да елиминира възможността от цервико-вагинална контаминация на ползваните ендометриални проби (менструална тъкан и ендометриална биопсия). Детектираните в настоящето проучване ексклузивно ендометриално локализирани патогени демонстрира възможността от инфекция на горен генитален тракт при

неинфектиран долен и докладва необходимостта от целева инфекциозна диагностика на горен генитален тракт. За целта излъчването на неинвазивна пробва, репрезентативна за горен генитален тракт, е ключово събитие в обособяването на диагностичен скринингов алгоритъм.

Бактериите *Gardnerella vaginalis* и *Ureaplasma parvum* бяха открити в 69,31% и 61,36% от всички позитивни менструални тъкани и 31,25% и 3,12% от всички бактериално инфектирани ендометриални биопсии.

Активна инфекция с *Mycomplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* беше детектирана с еквивалентна честота 2,27 % от позитивните за бактериални патогени менструални тъкани. Активна инфекция с *EBV, CMV, HHV-6* и *HHV-7* беше открита в 30%, 30%, 20% и 20% от позитивните за вирусни фактори ендометриални биопсии и в 40%, 7,5%, 10% и 42 ,5% от менструалните тъкани.

Следните бактериални и вирусни патогени не бяха открити в нито една от менструалните тъкани на изследваните пробанди: *Chlamydia trachomatis, Mycomplasma genitalium, HSV1, VZV* и *HHV-8*. В ендометриалните биопсии не бяха детектирани: *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycomplasma hominis/genitalium, HSV1/2, VZV* и *HHV-8.*

Както пояснихме освен за прицелния бактериално-вирусен панел, ендометриалните биопсии бяха тествани също за анаеробни и аеробни бактериални микроорганизми, част от които опортюнистични, както и коменсална фракция микроорганизми с цел проверка на ендометриалния баланс. Състояние на анаеробна и аеробна дисбактериоза беше открито съответно при 53,33% и 27% във всички ендометриални проби. Подобно изследване липсва върху пробандите с менструална тъкан, поради невъзможност от прилагане на ползвания метод върху този тип проба.

Установената инфекциозна фракция в настоящото проучване не припокри напълно докладваната според литературните данни, което намира обяснение в подбора на пациенти с отрицателен цервико-вагинален статус. Негативният статус на изследваните пробанди за инфекции на долен генитален тракт, респективно изключва контаминация привнесена от този отдел. Липсата на подобен критерий в докладваната в литературата честота на бактериална/вирусна инфекция, подсказва за евентуална цервико-вагинална контаминация на ендометриалните проби и обяснява отчетената по-висока честота на инфекция. В допълнение, при нашите пробанди беше докладвана и честа анамнеза за проведена антибиотична терапия в миналото, което логично обяснява по-ниската или липсваща застъпеност на определени патогени, като *Chlamydia trachomatis*. Популационна характеристика също може да е причина за наблюдаваните разлики в резултатите. Разнородността в анамнезата е друг ключов фактор за данните от проведените изследвания.

Положителните пробанди от всички групи бяха анализирани спрямо репродуктивната анамнеза с цел установяване на евентуална връзка между инфекциозен причинител и тип репродуктивна несполука. Беше установено, че *Ureaplasma parvum*,

Gardnerella vaginalis, CMV и *HHV-6* вероятно имат по-значима роля за настъпване на спонтанни аборти, докато други инфекции са замесени по-често в проблемна концепция.

Беше доказано, че менструалната тъкан, съдържаща части от функционалния ендометриален слой, представлява надеждна и информативна неинвазивна проба за инфекциозен скрининг на горен генитален тракт. Това беше потвърдено от сравнителния анализ на клиничната инфертилна група с менструална тъкан и контролната инфертилна група с еднодометриална биопсия. В двете групи наблюдавахме абсолютно съвпадение в процента на пациенти с положителен инфекциозен статус и разпределението им според бактериална или вирусна етиология. На ниво видово-специфичната извадка, менструалната тъкан и ендометриалната биопсия показаха известни разлики в детектираните проценти патогени, което намира логично обяснение в разнородност на извадката и анамнезата на пробандите.

Допълнително доказателство за репрезентативността на пробата е факта, че в споделено тестваната пациентска извадка 15 % с двата типа проби, (ендометриална биопсия и менструална тъкан), имаме 100% съпоставимост на резултатите.

Беше постигната естествена концепция при 97% от пациентите подложени на адекватна и правилна терапия за лечение на инфекциите. Обещаващите данни и безспорната медико-практическа полза на проучването са най-сериозните постижения на настоящия дисертационен труд.

Беше успешно разработен систематичен алгоритъм за диагностика на асимптоматични бактериални и вирусни инфекции в горен генитален тракт, чрез изследване на менструална тъкан/ендометриална биопсия и последващ терапевтичен мониторинг.

4.10. Създаване на биобанка с изолирани матрици тотална ДНК от менструална тъкан и ендометриална биопсия на жени с репродуктивни несполуки от български произход.

Екстракцията на тотална ДНК от прицелните проби за научно-изследователската дейност по настоящия дисертационен труд беше извършена в двоен и троен обем до тотално изчерпване на биологичните проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия. Определен обем от изолираните високомолекулни матрици тотална ДНК бяха предвидени за анализите в разработката, включително за евентуални повторения. Те бяха съхранявани на -20 ^{o}C след приключване на молекулярно-инфектологичните анализи.

Остатъчните ДНК матрици, изолирани от менструална тъкан и/или ендометриална биопсия на инфертилни пациентки бяха използвани за създаване на биобанка. ДНК пробите бяха обозначени с код, който е известен единствено на водещия изследовател (действащ докторант) и на преките му научни ръководители. Целта беше да бъдат правилно съхранени на (-70 ^{o}C), отлично охарактеризираните проби на български жени с репродуктивна несполука и придружаваща многофакторна медицинска информация, асоциирана с диагнозата безплодие. По този начин биобанката от селектираните ДНК молекули ще бъде на разположение на докторанта, научните му ръководители и сформиралите се научни

групи в периода на докторантурата му за бъдеща експериментална надграждаща научна дейност.

Разбира се замразените на -70 ºC ДНК матрици бяха подложени ежегодно на качествен контрол, който е еднократен. Качествения контрол се изразява в измерване чистота и концентрация на ДНК пробите посредством инструментите на спектрофотометрията, също и чрез nanodrop апарат. След това беше проведен PCR за намножаване на ендогенната вътрепна контрола *CD*. (Виж Материали и методи).

5. ИЗВОДИ:

5.1. Въведените "know-how" оптимизации в преданалитична предобработка, ДНК екстракция и PCR амплификация на *Chlamydia trachomatis* подсигуриха по-високо технологично и диагностично ниво на ефективност.

5.2. Сходната честота на позитивни инфекции и разпределение спрямо бактериална и/или вирусна компонента в инфертилната група с менструална тъкан и контролната група с ендометриална биопсии, потвърждават менструалната тъкан като репрезентативна проба за горен генитален тракт (100% съпоставимост).

5.3. Сравнителният анализ върху честотата и анамнезата на прицелните бактериално-вирусни патогени в проучването доказа асоциацията на *Ureaplasma parvum, Gardnerela vaginalis, HHV-6, CMV, EBV, HSV2* с безплодие, като внуши евентуална връзка вид патоген с тип клинико-патологична находка.

5.4. Инфекциозните фактори: Ureaplasma parvum, Gardnerella vaginalis, CMV и HHV-6 показаха по-сигнификантна асоциация за настъпване на спонтанни аборти, в сравнение с останалите инфекции.

5.5. Високата честота на *HHV-7* в менструална тъкан /ендометриална биопсия (42,5%/ 20%) и оскъдните научни данни, предопределя потенциалнатата асоциация на асимптоматична ендометриална инфекция с *HHV-7* с репродуктивна несполука.

5.6. Данните за ендометриален микробиом в ендометриални биопсии доказаха драстична разлика в долен генитален тракт: цервико-вагинална нормоценоза, контрастираща с масова ендометриална дисбиоза.

5.7. Установеният различен инфекциозен статус в горен и долен генитален тракт разкриват необходимостта от паралелна диагностика върху проби с цервико-вагинален и ендометриален произход.

5.8. Молекулно-инфектологичните данни от 15% споделена пациентска извадка, включваща изследване на менструална тъкан и ендометриална биопсия, утвърдиха менструалната тъкан като репрезентативна проба за горен генитален тракт (100% съпоставимост).

5.9. Високата терапевтична ефективност и реализирана 97% естествена концепция след изчистване на горен гнитален тракт от бактериално-вирусни инфекции в ендометриални биопсии, недвусмислено доказа нуждата от инфекциозен скрининг в ендометриум.

5.10. Създаденият систематичен алгоритъм за диагностика на „скрити“ асимптоматични инфекции в женски горен генитален тракт чрез изследване на неинвазивна биологична проба - менструална тъкан и последващ терапевтичен мониторинг постига много добри резултати.

6. БИБЛИОГРАФИЯ:

1). World Health Organization (2018) International Classification of Diseases, 11th Revision. WHO
2). Zayed AA., El-Hadidy MA. (2020) Sexual satisfaction and self-esteem in women with primary infertility. Middle East Fertil Soc J 25, 13
3). Mascarenhas MN., Flaxman SR., Boerma T., et al. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med 9(12):e1001356
4). Boivin J., Bunting L., Collins JA., et al. (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human reproduction 22(6):1506-12
5). Rutstein SO., Shah IH.. (2004) Infecundity infertility and childlessness in developing countries. World Health Organization
6). Recent advances in medically assisted conception. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1992;820:1-111.
7). Borumandnia N., Alavi Majd H., Khadembashi N., et. al. (2022) Worldwide trend analysis of primary and secondary infertility rates over past decades: A cross-sectional study. International Journal of Reproductive BioMedicine 18;20(1):37-46
8). Карагьозов И., Доганов Н., Атанасов А. (2005) Гинекология. Медицина и Физкулура 422
9). Sahana Devi, K.J., Yendapalli, V. Women Infertility: A Systematic Review of Effects and Causes. SN COMPUT. SCI. 4, 103 (2023). https://doi.org/10.1007/s42979-022-01510-5
10). Walker MH., Tobler KJ. (2022) Female Infertility. Treasure Island (FL): StatPearls
11). Santoro N., Filicori M., Crowley WF. (1986) Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. Endocr Rev 7(1):11-23
12). Ackerman KE., Patel KT., Guereca G., et. al. (2013) Cortisol secretory parameters in young exercisers in relation to LH secretion and bone parameters. Clin Endocrinol 78(1):114-9
13). Perkins RB., Hall JE., Martin KA. (1999) Neuroendocrine abnormalities in hypothalamic amenorrhea: spectrum, stability, and response to neurotransmitter modulation. J Clin Endocrinol Metab. 84(6):1905-11
14). Hull MG. (1987) Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. Gynecol Endocrinol. 1(3):235-45
15). Fauser BC., Van Heusden AM. (1997) Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. Endocr Rev. 18(1):71-106
16). Broekmans FJ., Soules MR., Fauser BC. (2009) Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. Endocr Rev. 30(5):465-93
17). Seppälä M., Ranta T., Hirvonen E. (1976) Hyperprolactinaemia and luteal insufficiency. Lancet. 31;1(7953):229-30
18). Mierla D., Malageanu M., Tulin R. (2015) Prevalence of chromosomal abnormalities in infertile couples in Romania. Balkan J Med Genet. 18(1):23-30
19). Singh V., Pakhiddey R. (2015) Current scenario on genetic basis of infertility- A review. Acta Med Int 2(2): 149-154
20). Simpson JL., Rajkovic A. (1999) Ovarian differentiation and gonadal failure. Am J Med Genet 89(4): 186-200
21). Otter M., Crins PML., (2021) Campforts BCM, Stumpel CTRM, van Amelsvoort TAMJ, Vingerhoets C. Social functioning and emotion recognition in adults with triple X syndrome. BJPsych Open. 7(2):e51
22). Yahaya TO., Oladele EO., Anyebe D., et al. (2021) Chromosomal abnormalities predisposing to infertility, testing, and management: a narrative review. Bull Natl Res Cent. 45:65
23). Cui X., Cui Y., Shi L., et al. (2018) A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment. Intractable Rare Dis Res. 7(4):223-8
24). Folsom LJ., Fuqua JS. (2015) Reproductive issues in women with Turner syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am 44(4): 723-737
25). Breehl L., Caban O. (2022) Genetics, gonadal dysgenesis. Treasure Island (FL): StatPearls
26). Chen B., Xu P., Wang J. (2019) The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS). Gene. 706:91-6
27). Culha C., Ozkaya M., Serter R., et al. (2012) Swyer's syndrome: in a fifty-year-old female. J Obstet Gynaecol India. 62(5):571-4
28). Barber TM., Franks S. (2013) Genetics of polycystic ovary syndrome. Front Horm Res 40: 28-39
29). Ndefo UA., Eaton A., Green MR. (2013) Polycystic ovary syndrome. Pharm Ther 38(6): 336-355
30). Shelling AN. (2000) X chromosome defects and premature ovarian failure. Aust N Z J Med 30(1): 5-7

31). Cordts EB., Christofolini DM., Dos Santos AA., et al. (2011) Genetic aspects of premature ovarian failure: A literature review. Arch Gynecol Obstet 283(3): 635-643
32). Chan YY., Jayaprakasan K., Zamora J., et al. (2011) The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review. Hum Reprod Update. 17(6):761-71
33). Pritts EA., Parker WH., Olive DL. (2009) Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. Fertil Steril. 91(4):1215-23
34). Casini ML., Rossi F., Agostini R., et al. (2006) Effects of the position of fibroids on fertility. Gynecol Endocrinol. 22(2):106-9
35). Pérez-Medina T., Bajo-Arenas J., Salazar F., et al. (2005) Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. Hum Reprod. 20(6):1632-5
36). Olive DL., Pritts EA. (2001) Treatment of endometriosis. N Engl J Med. 26;345(4):266-75
37). Prescott J., Farland LV., Tobias DK., et al. (2016) A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. Hum Reprod. 31(7):1475-82
38). Van Voorhis BJ., Mejia RB., Schlaff WD., et al. (2019) Is removal of hydrosalpinges prior to in vitro fertilization the standard of care? Fertil Steril. 111(4):652-656
39). Meyer WR., Castelbaum AJ., Somkuti S., et al. (1997) Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. Hum Reprod. 12(7):1393-8
40). Lederberg, J., McCray, A.T. (2001) 'Ome Sweet 'Omics—A Genealogical Treasury of Words. Genealogical Treasury of Words. 15(7):8
41). Peterson J., Garges S., Giovanni, M., et al. (2009) The NIH Human Microbiome Project. Genome Res. 19, 2317–2323
42). Baker J.M., Chase D.M., Herbst-Kralovetz M.M. (2018) Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders ? Front. Immunol. 9, 208
43). Benner M., Ferwerda G., Joosten I., et al. (2018) How Uterine Microbiota Might Be Responsible for a Receptive, Fertile Endometrium. Hum. Reprod. Update 24, 393–415
44). Chen C., Song X., Wei W., et al. (2017) The Microbiota Continuum along the Female Reproductive Tract and Its Relation to Uterine-Related Diseases. Nat. Commun. 8, 875
45). Wee B.A., Thomas M., Sweeney, et al. (2018) A Retrospective Pilot Study to Determine Whether the Reproductive Tract Microbiota Differs betweenWomen with a History of Infertility and FertileWomen. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 58, 341–348
46). Ichiyama T., Kuroda K., Nagai Y., et al. (2021) Analysis of Vaginal and Endometrial Microbiota Communities in Infertile Women with a History of Repeated Implantation Failure. Reprod. Med. Biol. 20, 334–344
47). Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E., et al. (2015) Colonization of the Upper Genital Tract by Vaginal Bacterial Species in NonpregnantWomen. Am. J. Obstet. Gynecol. 212, 611.e1–611.e9
48). Moreno I., Codoñer F.M., Vilella F., et al. (2016) Evidence That the Endometrial Microbiota Has an Effect on Implantation Success or Failure. Am. J. Obstet. Gynecol. 215, 684–703
49). Verstraelen H., Vilchez-Vargas R., Desimpel F., et al. (2016) Characterization of the Human Uterine Microbiome in Non-Pregnant Women through Deep Sequencing of the V1-2 Region of the 16S RRNA Gene. PeerJ 4, e1602
50). Tao X., Franasiak J.M., Zhan Y., et al. (2017) Characterizing the Endometrial Microbiome by Analyzing the Ultra-Low Bacteria from Embryo Transfer Catheter Tips in IVF Cycles: Next Generation Sequencing (NGS) Analysis of the 16S Ribosomal Gene. Hum. Microbiome J. 3, 15–21
51). Kyono K., Hashimoto T., Nagai Y., et al. (2018) Analysis of Endometrial Microbiota by 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing among Infertile Patients: A Single-Center Pilot Study. Reprod. Med. Biol. 17, 297–306
52). Moreno I., Garcia-Grau I., Perez-Villaroya D., et al. (2021) Endometrial Microbiota Composition Is Associated with Reproductive Outcome in Infertile Patients. medRxiv 4;10(1):1
53). Li F., Chen C., Wei W., et al. (2018) The Metagenome of the Female Upper Reproductive Tract. GigaScience 7, giy107
54). Winters A.D., Romero R., Gervasi M.T., et al. (2019) Does the Endometrial Cavity Have a Molecular Microbial Signature ? Sci. Rep. 9, 9905
55). Wang J., Li Z., Ma X., et al. (2021) Translocation of Vaginal Microbiota Is Involved in Impairment and Protection of Uterine Health. Nat. Commun. 12, 4191
56). Achilles S.L., Austin M.N., Meyn L.A., et al. (2018) Impact of Contraceptive Initiation on Vaginal Microbiota. Am. J. Obstet. Gynecol. 218, 622.e1–622.e10
57). Yeoman C.J., Yildirim S., Thomas S.M., et al. (2010) Comparative Genomics of Gardnerella Vaginalis Strains Reveals Substantial Differences in Metabolic and Virulence Potential. PLoS ONE 5, e12411

58). Fu M., Zhang X., Liang Y., et al. (2020) Alterations in Vaginal Microbiota and Associated Metabolome inWomen with Recurrent Implantation Failure. mBio 11, e03242-19
59). Kitaya K., Tada Y., Hayashi T., et al. (2014) Comprehensive Endometrial Immunoglobulin Subclass Analysis in Infertile Women Suffering from Repeated Implantation Failure with or without Chronic Endometritis. Am. J. Reprod. Immunol. 72, 386–391
60). Tseng J.F., Ryan I.P., Milam T.D., et al. (1996) Interleukin-6 Secretion in Vitro Is up-Regulated in Ectopic and Eutopic Endometrial Stromal Cells from Women with Endometriosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 1118–1122
61). Sikora J., Mielczarek-Palacz A., Kondera-Anasz Z. (2016) Association of the Precursor of Interleukin-1_ and Peritoneal Inflammation- Role in Pathogenesis of Endometriosis. J. Clin. Lab. Anal. 30, 831–837
62). Liu Y., Ko EY., Wong K.K.-W., et al. (2019) Endometrial Microbiota in Infertile Women with and without Chronic Endometritis as Diagnosed Using a Quantitative and Reference Range-Based Method. Fertil. Steril. 112, 707–717.e1
63). Khan K.N., Fujishita A., Masumoto H., et al. (2016) Molecular Detection of Intrauterine Microbial Colonization in Women with Endometriosis. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 199, 69–75
64). Wessels J.M., Domínguez M.A., Leyland N.A., et al. (2021) Endometrial Microbiota Is More Diverse in People with Endometriosis than Symptomatic Controls. Sci. Rep. 11, 18877
65). Hernandes C., Silveira P., Rodrigues Sereia A.F., et al. (2020) Microbiome Profile of Deep Endometriosis Patients: Comparison of Vaginal Fluid, Endometrium and Lesion. Diagnostics 10, 163
66). Cregger M.A., Lenz K., Leary E., et al. (2017) Reproductive Microbiomes: Using the Microbiome as a Novel Diagnostic Tool for Endometriosis. Reprod. Immunol. Open Access 2, 36
67). Cicinelli E., de Ziegler D., Nicoletti R., et al. (2008) Chronic Endometritis: Correlation among Hysteroscopic, Histologic, and Bacteriologic Findings in a Prospective Trial with 2190 Consecutive Office Hysteroscopies. Fertil. Steril. 89, 677–684
68). Sparks R.A., Purrier B.G., Watt P.J., et al. (1981) Bacteriological Colonisation of Uterine Cavity: Role of Tailed Intrauterine Contraceptive Device. BMJ 282, 1189–1191
69). Pereira N., Hutchinson A.P., Lekovich J.P., et al. (2016) Antibiotic Prophylaxis for Gynecologic Procedures Prior to and during the Utilization of Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review. J. Pathog. 4698314
70). Svenstrup H.F., Fedder J., Abraham-Peskir J., et al. (2003) Mycoplasma Genitalium Attaches to Human Spermatozoa. Hum. Reprod. 18, 2103–2109
71). Giakoumelou S., Wheelhouse N., Brown J., et. al., (2001) Chlamydia trachomatis infection of human endometrial stromal cells induces defective decidualisation and chemokine release. Scientific Reports 7(1):2001
72). Michou V, Constantoulakis P, Makarounis K, et.al. (2013) Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis collected by women with a history of infertility. J. Obstet. Gynaecol. Res. 40(1):237-42
73). Lis R., Rowhani-Rahbar A., Manhart LE. (2015) Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. Clin Infect Dis 61:418–26
74). Swidsinski A., Verstraelen H., Loening-Baucke V., et al. (2013) Presence of a Polymicrobial Endometrial Biofilm in Patients with Bacterial Vaginosis. PLoS ONE 8(1): e53997
75). Maidji E., Percivalle E., Gerna G., et al. (2002) Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. Virology 304:53–69
76). Naumenko V., Tyulenev Y., Kurilo L., et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4–6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. J Andrology ISSN: 2047-2919
77). Dyer SJ. (2009) International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: Potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod 9: 2379–2380
78). Ness RB., Goodman MT., Shen C., et al. (2003) Serologic evidence of past Chlamydia trachomatis, in relation to ovarian cancer. J Infect Dis 187: 1147–1152
79). Baud D., Goy G., Jaton K. et al. (2011) Role of Chlamydia trachomatis in miscarriages. Emerg Infect Dis 17: 1630–1635
80). Shanmughapriya S., Senthilkumar G., Vinodhini K., et al. (2012) Viral and bacterial aetiologies of epithelial ovarian cancer. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31: 2311–2317
81). Viniker DA. (1999) Hypothesis on the role of sub-clinical bacteria of the endometrium (bacteria endometrialis) in gynecological and obstetric enigmas. Hum Reprod Update 5: 373–385
82). Low N. (2004) Current status of chlamydia screening in Europe. Euro Surveill. 8(41)
83). Carey AJ., Beagley KW. (2010) Chlamydia trachomatis, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. Am J Reprod Immunol. 63:576-586

84). Mardh PA., Westrom L., Ripa KT., et al. (1983) Pelvic inflammatory disease: clinical, etiologic, and pathophysiologic studies In: Holmes KK, Mardh PA, ed. International perspectives on neglected sexually transmitted diseases: impact on venereology, infertility, and maternal and infant health. Washington, D.C., Hemisphere Publishing Corporation
85). Weström L., Joesoef R., Reynolds G., et al. (1992) Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. Sex Transm Dis. Jul-Aug;19(4):185-92
86). Weström L. (1980) Incidence, prevalence, and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrialized countries. Am J Obstet Gynecol. 138(7 Pt 2):880-92
87). Lepine LA., Hillis SD., Marchbanks PA., et al. (1998) Severity of pelvic inflammatory disease as a predictor of the probability of live birth. Am J Obstet Gynecol. 178(5):977-81
88). Adams EJ., Turner KM., Edmunds WJ. (2007) The cost effectiveness of opportunistic chlamydia screening in England. Sex Transm Infect. 83:267-74
89). Jabbour H. N., Critchley, H. O. D. (2001) Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. Reproduction 121, 197–205
90) Salker M., Teklenburg G., Molokhia M., et al. (2010) Natural selection of human embryos: Impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PLoS One 5, e10287
91). Baud D., Goy G., Jaton K., et al. (2011) Role of Chlamydia trachomatis in miscarriage. Emerg. Infect. Dis. 17, 1630–5
92). Kortekangas-Savolainen O., Mäkinen J., Koivusalo K., et al. (2012) Hospital-diagnosed late sequelae after female Chlamydia trachomatis infections in 1990–2006 in Turku, Finland. Gynecol. Obstet. Invest. 73, 299–303
93). Wilkowska-Trojniel M., Zdrodowska-Stefanow B., Ostaszewska-Puchalska I., et al. (2009) The influence of Chlamydia trachomatis infection on spontaneous abortions. Adv. Med. Sci. 54, 86–90
94). Licciardi F., Grifo JA., Rosenwaks Z., (1992) Relation between antibodies to Chlamydia trachomatis and spontaneous abortion following in vitro fertilization. J. Assist. … 9, 207–10
95). Warner JA., Zwezdaryk KJ., Day B., et al. (2012) Human cytomegalovirus infection inhibits CXCL12- mediated migration and invasion of human extravillous cytotrophoblasts. Virol. J. 9, 255
96). Huang Y., Zhu XY., Du MR., et al. (2006) Chemokine CXCL16, a scavenger receptor, induces proliferation and invasion of first-trimester human trophoblast cells in an autocrine manner. Hum. Reprod. 21, 1083–91
97). Isozaki T., Arbab A., Haas C. (2013) Evidence that CXCL16 is a potent mediator of angiogenesis and is involved in endothelial progenitor cell chemotaxis: studies in mice with K/BxN serum-induced arthritis. Arthritis … 65, 1–20
98). Peipart JF. (2003) Clinical practice. Genital chlamydial infections. NEJM. 349:2424-30
99). Hammerschlag MR. (1999) Chlamydial infections in infants and children. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw Hill; p. 593
100). Moss TR. (2006) International handbook of Chlamydia, 2nd ed. Haslemere, Surrey, UK : Euromed Communications
101). Barlow RE., Cooke ID., Odukoya O. et al. (2001) The prevalence of Chlamydia trachomatis in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridization. J Med Microbiol 50: 902–908
102). Toth M., Patton DL., Campell LA. et al. (2000) Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. Am J Reprod Immunol 43: 218–222
103). Yokoi S., Maeda S., Kubota Y., et al. (2007) The Role of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum Biovar 2 in Postgonococcal Urethritis Clin Infect Dis. 45(7):866-71
104). Vesić S., Vukićević J., Gvozdenović E., et al. (2010) Chlamydia trachomatis and urogenital mycoplasmas in nongonococcal urethritis in men, 63(1-2):47-50
105). Denks K, Spaeth EL, Jõers K., et al. (2007) Coinfection of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. Scand J Infect Dis, 39(8):714-8
106). Kahn RH., Mosure DJ., Blank S., et al (2005) Jail STD Prevalence Monitoring Project. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae prevalence and coinfection in adolescents entering selected US juvenile detention centers, 1997-2002, Sex Transm Dis, 32(4):255-9
107). Taylor-Robinson D. (1996) Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. Clin Infect Dis. 23(4):671-82
108). Waites KB., Katz B., Schelonka RL. (2005) Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 18(4):757-89

109). Khan J., Farzand R. (2011) Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum among women with unexplained infertility, with and without vaginitis and cervicitis. African Journal of Microbiology Research. Vol. 5(8), pp. 861-864
110). Maxwell NC., Davies PL., Kotecha S. (2006) Antenatal infection and inflammation: what's new ? Curr Opin Infect Dis. 19(3):253–258
111). Goldenberg RL., Culhane JF., Iams JD., et al. (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet. 371:75–84
112). Taylor-Robinson D., Waites K., Cassell G. (2003) Genital Mycoplasmas, p. 127–139. In S. A. Morse, R. C. Ballard, K. K. Holmes, and A. A. Moreland (ed.), Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS, 3rd ed. Mosby, New York
113). Waites KB., Schelonka RL., Xiao L., et al. (2009) Congenital and opportunistic infections. Ureaplasma species and mycoplasma hominis. Semin Fetal Neonatal Med. 14(4):190–199
114). Gdoura R., Kchaou W., Chaari C., et al. (2007) Ureaplasmaurealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. BMC Infect 7:129
115). Patai K., Szilagyi G., Hubay M., et al (2005) Severe endometritis caused by genital mycoplasmas after Caesarean section. J Med Microbiol. 54:1249-50
116). Pararas MV., Skevaki CL., Kafetzis DA. (2006) Preterm birth due to maternal infection: causative pathogens and modes of prevention. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25:562-9
117). McDonald HM., O'Loughlin JA., Jolley PT., et al (1994) Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth. J Infect Dis. 170:724-8
118). Goldenberg RL., Andrews WW., Goepfert AR., et al. (2008) The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants. Am J Obstet Gynecol 198: 43 e41–45
119). Sung TJ. (2010) Ureaplasma infections in pre-term infants: Recent information regarding the role of Ureaplasma species as neonatal pathogens. Korean J Pediatr 53: 989–993
120). Viscardi RM., Hashmi N., Gross GW., et al. (2008) Incidence of invasive ureaplasma in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. J Perinatol 28: 759–765
121). Redline RW. (2012) Inflammatory response in acute chorioamnionitis. Semin Fetal Neonatal Med 17: 20–25
122). von Chamier M., Allam A., Brown MB. et al (2012) Host Genetic Background Impacts Disease Outcome During Intrauterine Infection with Ureaplasma parvum. PLoS ONE 7(8): e44047
123). Kasper DC., Mechtler TP., Reischer GH., et al. (2010) The bacterial load of Ureaplasma parvum in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response. Diagn Microbiol Infect Dis 67: 117–121
124). Crouse DT., Odrezin GT., Cutter GR., Reese JM., et al. (1993) Radiographic changes associated with tracheal isolation of Ureaplasma urealyticum from neonates. Clin Infect Dis 17 Suppl 1: S122–130
125). Viscardi R., Manimtim W., He JR., et al. (2006) Disordered pulmonary myofibroblast distribution and elastin expression in preterm infants with Ureaplasma urealyticum pneumonitis. Pediatr Dev Pathol 9: 143–151
126). Viscardi RM., Hashmi N., Gross GW., et al. (2008) Incidence of invasive ureaplasma in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. J Perinatol 28: 759–765
127). Sanchez PJ., Regan JA. (1990) Vertical transmission of Ureaplasma urealyticum from mothers to preterm infants. Pediatr Infect Dis J 9: 398–401
128). Oue S., Hiroi M., Ogawa S., et al. (2009) Association of gastric fluid microbes at birth with severe bronchopulmonary dysplasia. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 94: F17–22
129). Menon R., Taylor RN., Fortunato SJ. (2010) Chorioamnionitis–a complex pathophysiologic syndrome. Placenta 31: 113–120
130). Gantert M., Been JV., Gavilanes AW., et al. (2010) Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus ? J Perinatol 30 Suppl: S21–30
131). Buhimschi C.S, Bhandari V., Han YW., et al. (2009) Using proteomics in perinatal and neonatal sepsis: hopes and challenges for the future. Curr Opin Infect Dis 22: 235–243
132). Romero R., Kusanovic JP., Gotsch F., et al. (2010) Isobaric labeling and tandem mass spectrometry: a novel approach for profiling and quantifying proteins differentially expressed in amniotic fluid in preterm labor with and without intra-amniotic infection/inflammation. J Matern Fetal Neonatal Med 23: 261–280
133). Horowitz S., Mazor M., Horowitz J., et al (1995) Antibodies to Ureaplasma urealyticum in women with intraamniotic infection and adverse pregnancy outcome. Acta Obstet Gynecol Scand 74: 132–136
134). Horowitz S., Mazor M., Romero R., et al (1995) Infection of the amniotic cavity with Ureaplasma urealyticum in the midtrimester of pregnancy. J Reprod Med 40: 375–379

135). Sung TJ., Xiao L., Duffy L., et al. (2011) Frequency of ureaplasma serovars in respiratory secretions of preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. Pediatr Infect Dis J 30: 379–383
136). Dando SJ., Nitsos I., Kallapur SG., et al. (2012) The role of the multiple banded antigen of Ureaplasma parvum in intra-amniotic infection: major virulence factor or decoy ? PLoS One 7: e29856
137). Redline RW. (2006) Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord. Semin Fetal Neonatal Med 11: 296–301
138). Menon R., Williams SM., Fortunato SJ. (2007) Amniotic fluid interleukin-1beta Nand interleukin-8 concentrations: racial disparity in preterm birth. Reprod Sci 14: 253–259
139). Menon R., Thorsen P., Vogel I., et al. (2008) Racial disparity in amniotic fluid concentrations of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and soluble TNF receptors in spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol 198: 533 e531–510
140). Velez DR., Fortunato SJ., Thorsen P. et al. (2008) Preterm birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants. PLoS One 3: e3283
141). Velez DR., Fortunato S., Thorsen P., et al. (2009) Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and nflammatory response gene variants. Am J Obstet Gynecol 200: 209 e201–227
142). Macones GA., Parry S., Elkousy M., et al. (2004) A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol 190: 1504–1508; discussion 1503A
143). Fenkci V., Yilmazer M., Aktepe O. (2002) Have Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections any significant effect on women fertility? Infez Med 10:220-223
144). Rosemond A., Lanotte P., Watt S., et al. (2006) Systematic screening tests for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in urogenital specimens of infertile couples. Patholol Biol 54:125-129
145). Günyeli İ., Abike F., Dünder İ., et al. (2011) Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. Arch Gynecol Obstet 283:379-385
146). Miron ND., Socolov D., Mareş M., et al. (2013) Bacteriological agents which play a role in the development of infertility. Acta Microbiol Immunol Hung 60:41-53
147). Verteramo R., Patella A., Calzolari E., et al. (2013) An epidemiological survey of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in gynaecological outpatients, Rome, Italy. Epidemiol Infect 141:2650-2657
148). Zdrodowska-Stefanow B., Kłosowska W., Ostaszewska-Puchalska I., et al. (2006) Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. Adv Med Sci 51:250-253
149). Tavo V. (2013) Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplazma urealyticum among women of reproductive age in Albania. Med Arch 67:25
150). Bayraktar MR., Ozerol IH., Gucluer N., et al. (2010) Prevalence and antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in pregnant women. Int J Infect Dis 14:e90–e95
151). Allanson B., Jennings B., Jacques A., et al. (2010) Infection and fetal loss in the mid-second trimester of pregnancy. Aust N Z J Obstet Gynaecol 50:221–225
152). Witkin SS., Kliman I., Grifo JA., et al. (1995) Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis detected by the polymerase chain reaction in the cervices of women undergoing in vitro fertilization: Prevalence and consequences. J Assist Reprod Genet 112: 610–614
153). Mousavi A., Farhadifar F., Mirnejad R., et. al. (2014) Detection of genital mycoplasmal infections among infertile females by multiplex PCR. Iranian J of Microbiology, 6(6): 398–403
154). Al-Kayat ES. (2015) Prevalence of two species of genital mycoplasmas among infertile women attended to infertility clinic in Thi-Qar. TQMJ
155). Bartkeviciene D., Opolskiene G., Bartkeviciute A, et. al. (2020) The impact of Ureaplasma infections on pregnancy complications. Libyan Journal of Medicine, 15:1, 1812821
156). Donders GG., Van Calsteren C., Bellen G., et al. (2010) Association between abnormal vaginal flora and cervical length as risk factors for preterm birth. Ultrasound Obstet Gynecol 20104531
157). Clausen HF., Fedder J., Drasbek M., et al. (2001) Serological investigation of Mycoplasma genitalium in infertile women. Hum Reprod 16:1866-1874
158). Taylor-Robinson D., Jensen JS. (2011) Mycoplasma genitalium: from chrysalis to multicolored butterfly. Clin Microbiol Rev 24:498–514
159). Campos G., Marques L, Rezende I., et al. (2018) Mycoplasma genitalium can modulate the local immune response in patients with endometriosis. J Fertility and Sterility
160). Clausen HF., Fedder J., Drasbek M., et al. (2001) Serological investigation of Mycoplasma genitalium in infertile women. Hum Reprod 16:1866–74

161). Svenstrup HF., Fedder J., Kristoffersen SE., et al. (2008) Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility—a prospective study. Fertil Steril 90:513–20
162). Idahl A., Jurstrand M., Olofsson JI., et al. (2015) Mycoplasma genitalium serum antibodies in infertile couples and fertile women. Sex Transm Infect 91(8):589-91
163). Manhart LE., Critchlow CW., Holmes KK., et al. (2003) Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. J Infect Dis 187:650–7
164). Anagrius C., Lore B., Jensen J. (2005) Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. Sex Transm Infect 81:458-462
165). Bjartling C., Osser S., Persson K. (2010) The association between Mycoplasma genitalium and pelvic inflammatory disease after termination of pregnancy. BJOG 117:361–4
166). Short VL., Jensen JS., Nelson DB., et al. (2010) Mycoplasma genitalium among young, urban pregnant women. Infect Dis Obstet Gynecol 984760
167). Edwards RK., Ferguson RJ., Reyes L., et al. (2006) Assessing the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract. J Matern Fetal Neonatal Med 19:357–63
168). Rowlands S., Danielewski JA., Tabrizi SN., et al. (2017) Microbial invasion of the amniotic cavity in midtrimester pregnancies using molecular microbiology. Am J Obstet Gynecol 217:e1–5
169). Jurstrand M., Jensen JS., Magnuson A., et al. (2007) A serological study of the role of Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease and ectopic pregna Sex Transm Infect 83:319–23
170). Verstraelen H., Verhelst R. (2009) Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 7: 1109–24
171). Muzny CA., Blanchard E., Taylor CM., et al. (2018) Identification of key bacteria involved in the induction of incident bacterial vaginosis: a prospective study. J Infect Dis 218:966–78
172). Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., et al. (2005) Adherent biofilms in bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 106: 1013–23
173). Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., et al. (2008) An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. Am J Obstet Gynecol 198: 97.e1–6.1
174). Bradshaw CS., Morton AN., Hocking J., et al. (2006) High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. J Infect Dis 193:1478–86
175). Oakeshott P., Hay P., Hay S., et al. (2002) Association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks' gestation: prospective community based cohort study. BMJ 325: 1334
176). Leitich H., Kiss H. (2007) Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 21: 375–90
177). Ralph SG., Rutherford AJ., Wilson JD. (1999) Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. BMJ 319: 220–3
178). Andrews WW., Hauth JC., Cliver SP., et al. (2006) Association of asymptomatic bacterial vaginosis with endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis in nonpregnant women. Am J Obstet Gynecol 195: 1611–6
179). Campisciano G., Florian F., D'Eustacchio A., et al. (2017) Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. J Cell Physiol 232:1681–8
180). Gaudoin M., Rekha P., Morris A., et al. (1999) Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strongly and independently associated with tubal infertility but do not affect in vitro fertilization success rates. Fertil Steril 72:730–2
181). Liversedge NH., Turner A., Horner PJ., et al. (1999) The influence of bacterial vaginosis on in-vitro fertilization and embryo implantation during assisted reproduction treatment. Hum Reprod 14: 2411–5
182). Wee BA., Thomas M., Sweeney EL., et al. (2018) A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. Aust N Z J Obstet Gynaecol 58:341–8
183). Wiggins R., Hicks SJ., Soothill PW., et al. (2001) Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. Sex Transm Infect 77:402–8
184). Kamiyama S., Teruya Y., Nohara M., et al. (2004) Impact of detection of bacterial endotoxin in menstrual effluent on the pregnancy rate in in vitro fertilization and embryo transfer, Fertil Steril., 82(4), 788-92
185). Romero R., ManogueK., Mitchell M., et al. (1989) Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor, Am J Obstet Gynecol., 161(2), 336-41

186). van Teijlingen NH., Helgers LC., Zijlstra-Willems EM., et al. (2020) Vaginal dysbiosis associated bacteria Megasphaera elsdenii and Prevotella timonensis induce immune activation via dendritic cells. J Reprod Immunol 138: 103085
187). Lennard K., Dabee S., Barnabas SL., et al. (2017) Microbial composition predicts genital tract inflammation and persistent bacterial vaginosis in South African adolescent females. Infect Immun 86:e00410–7
188). Spandorfer SD., Neuer A., Giraldo PC., et al. (2001) Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. J Reprod Med 46:806–10
189). Atashili J., Poole C., Ndumbe PM., et al. (2008) Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS 22:1493–501
190). Leitich H., Bodner-Adler B., Brunbauer M., et al. (2003) Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a metaanalysis. Am J Obstet Gynecol 189: 139–47
191). Bautista CT., Wurapa EK., Sateren WB., et al. (2017) Association of bacterial vaginosis with chlamydia and gonorrhea among women in the U.S. Army. Am J Prev Med 52:632–9
192). Wiesenfeld HC., Hillier SL., Krohn MA., et al. (2002) Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. Obstet Gynecol 100:456–63
193). Whitley RJ., Roizman B. (2001) Herpes simplex virus infections. Lancet 357: 1513 – 1518
194). Michou V., Liarmakopoulou S., Thomas D., et al. (2012) Herpes virus infected spermatozoa following density gradient centrifugation for IVF purposes. Andrologia. Jun;44(3):174-180
195). Nigro G., Mazzocco M., Mattia E., et al. (2011) Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. J Matern Fetal Neonatal Med. 21261443
196). Margolis TP., Imai Y., Yang L., et al. (2007) Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) establishes latent infection in a different population of ganglionic neurons than HSV-1: role of latency-associated transcripts. J Virol 81:1872–1878
197). Kapranos N., Petrakou E., Anastasiadou C., et al. (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein- Barr virus in semen of men attending an infertility clinic. Fertil Steril 79(Suppl): 1566-1570
198). Ward PL., Roizman B. (1994) Herpes simplex genes: The blueprint of a successful human pathogen. Trends in Genetics 10: 267-274
199). Roizman B., Kovler MR., Desrosiers RC., et al. (1992) The family herpesviridae: An update. ArchVirol 123: 423-449
200). Kotronias D., Kapranos N. (1998) Detection of herpes simplex virus DNA in human spermatozoa by in situ hybridization technique. In Vivo 12: 391-394
201). Forsgren M., Malm G. (1996) Herpes simplex virus and pregnancy. Scand J Infect Dis Suppl 100: 14-19
202). Freij BJ. Sever JL. (1988) Herpesvirus infections in pregnancy: risks to embryo, fetus, and neonate. Clin Perinatol 15: 203-231
203). El Borai N., Inoue M., Lefevre C., et al. (1997) Detection of herpes simplex virus DNA in semen and menstrual blood of individuals attending an infertility clinic. J Obstetr Gynaecol Res 23: 17-24
204). Kapranos NC, Kotronias DC. (2009) Detection of Herpes Simplex Virus in First Trimester Pregnancy Loss Using Molecular Techniques. in vivo 23: 839-842
205). Gonik B., Loftin KC., Tan, et al. (1990) Immune modulation of natural killer cell cytotoxicity against herpes infected target cells in pregnancy. Am J Reprod Immunol 24: 95-98
206). Yamada H., Kato EH., Kobashi G., et al. (2001) High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. Am J Reprod Immunol 46: 132-136
207). Kokawa K., Shikone T., Nakano R. (1998) Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. Placenta 19: 21-26
208). Sutherland MR., Raynor CM., Leenknegt, et al (1997) ELG: Coagulation initiated on herpesviruses. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13510-13514
209). Stagno S., Reynolds DW., Pass RF., et al. (1980) Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. N. Engl. J. Med. 302:1073–1076
210). Fowler K.B., Pass RF. (1991) Sexually transmitted diseases in mothers of neonates with congenital cytomegalovirus infection. J. Infect. Dis. 164: 259–264
211). Pass R.F., Little EA., Stagno S., et al (1987) Young children as a probable source of maternal and congenital cytomegalovirus infection. N. Engl. J. Med. 316:1366–1370
212). Soderberg-Naucler C., Fish KN., Nelson JA. (1997) Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. Cell 91:119–126

213). Suganuma E., Oka A., Sakata H., et al. (2018) 10-year follow-up of con-genital cytomegalovirus infection complicated with severe neurological findings in infancy: a case re-port. BMC Pediatr. 18(1):369
214). Revello MG., Zavattoni M., Furione M., et al (2002) Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. J. Infect. Dis. 186:553–557
215). Pereira l., Maidji E., McDonagh a., et al. (2003) Human Cytomegalovirus Transmission from the Uterus to the Placenta Correlates with the Presence of Pathogenic Bacteria and Maternal Immunity. JOURNAL OF VIROLOGY, p. 13301–13314
216). Fisher S., Genbacev O., Maidji E., et al (2000) Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. J Virol 74:6808–6820
217). Chou D., Ma Y., Zhang J., et al (2006) Cytomegalovirus infection of trophoblast cells elicits an inflammatory response: a possible mechanism of placental dysfunction. Am J Obstet Gynecol 194:535–541
218). Chan G., Hemmings DG., Yurochko AD., et al (2002) Human cytomegalovirus-caused damage to placental trophoblasts mediated by immediate-early gene-induced tumor necrosis factor-a. Am J Pathol 161:1371–1381
219). Clark DA., Chaouat G., Arck PC., et al (1998) Cytokine-dependent abortion inCBA×DBA/2mice ismediated by the procoagulant fgl2prothrombinase [correction of prothombinase]. J Immunol 160:545–549
220). Tao L., Suhua C., Juanjuan C., et al (2011) In vitro study on human cytomegalovirus affecting early pregnancy villous EVT's invasion function. Virol J 8:114
221). Panagiotakis SH., Soufla G., Baritaki S., et al. (2007) Concurrent CMVand EBV DNAemia is significantly correlated with a delay in the response to HAART in treatment-naive HIV type 1-positive patients. AIDS Res Hum Retroviruses 23:10–8
222). World Health Organization. (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press
223). Enbom M., Strand A., Falk KI., et al (2001) Detection of Epstein–Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. Sex Transm Dis. 28:300–6
224). Haeri S., Baker AM., Boggess KA. Et al (2010) Prevalence of Epstein– Barr virus reactivation in pregnancy. Am JPerinatol. 27:715–19
225). Bayati AH., Al-Bayaa YS., Alwan SN., et al (2017) Detection of Cytomegalovirus and Epstein Barr Virus in Placental Tissues of Aborted Women. Biomedical & Pharmacology Journal Vol. 10(1), 221-229
226). Avgil M., Ornoy A. (2006) Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy: consequences of neonatal or intrauterine infection. Reprod Toxicol. 21(4):436-45
227). Gervasi MT., Romero R., Bracalente G., et al (2012) Viral invasion of the amniotic cavity (VIAC) in the midtrimester of pregnancy. J Matern Fetal Neonatal Med. 25(10)
228). Tomai XH. (2011) Stillbirth following severe symmetric fetal growth restriction due to reactivation of Epstein–Barr virusinfection in pregnancy. J. Obstet. Gynaecol. Res. 37(12):1877-82
229). Bezold G., Politch JA., Kiviat NB., et al (2007) Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. Fertil Steril 87:1087–97
230). Bezold G., Schuster-Grusser A., Lange M., et al (2001) Prevalence of human herpesvirus types 1–8 in the semen of infertility patients and correlation with semen parameters. Fertil Steril 76:416–8
231). Pritchett JC., Nanan R., Neuman MG. (2012) The Link between Hypersensitivity Syndrome Reaction Development and Human Herpes Virus-6 Reactivation. Int J Hepatol 723062
232). Siddon A., Lozovatsky L., Mohamed A., (2012) Hudnall SD. Human herpesvirus 6 positive Reed-Sternberg cells in nodular sclerosis Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 158: 635–643
233). Broccolo F., Drago F., Cassina G., et al. (2013) Selective reactivation of human herpesvirus 6 in patients with autoimmune connective tissue diseases. J Med Virol. 85(11):1925-34
234). Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., et al. (2014) Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. Arch Virol 159: 863–870
235). Wang H., Chen M., Berneman ZN., et al (1994) Detection of human herpesvirus-6 in paraffin-embedded tissue of cervical cancer by polymerase chain reaction. J Virol Methods. 47: 297–305
236). Ohashi M., Yoshikawa T., Ihira M., et al. (2002) Reactivation of human herpesvirus 6 and 7 in pregnant women. J Med Virol 67: 354–358
237). Yadav M., Arivananthan M., Kumar S. (1996) HHV-6 antigen and viral DNA detected in cervical cells from archived tissue using histochemical staining and hybridization. Clin Diagn Virol. 7(1):23-33
238). Bortolotti D., Gentili V., Rotola A. et al. (2019) HHV-6A infection of endometrial epithelial cells affects immune profile and trophoblast invasion. Am J Reprod Immunol. 82:e13174
239). McAuley JL., Corcilius L., Tan HX., et al (2017) The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. Mucosal Immunol. 10(6):1581-1593

240). Rizzo R., Vercammen M., van de Velde H., et al (2011) The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. Cell Mol Life Sci. 68(3):341-352
241). Griffiths PD., Clark DA., Emery VC. Et al (2000) Betaherpesviruses in transplant recipients. J Antimicrob Chemother 45(Suppl T3):29–34
242). Thomas D., Michou V., Tegos V., et al. (2004) The effect of valacyclovir treatment on natural killer cells of infertile women. Am J Reprod Immunol 51:248–55
243). Okuno T., Oishi H., Hayashi K., et al. (1995) Human Herpesviruses 6 and 7 in Cervixes of Pregnant Women. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July, p. 1968–1970 Vol. 33, No. 7
244). Lamont R., Sobel J., Carrington D., et al. (2011) Varicella-zoster virus (chickenpox) infection in pregnancy. BJOG, 118(10):1155-62
245). Volpi A. (2007) Severe complications of herpes zoster. Herpes 14(Suppl 2):35–9. 2494
246). Dourmishev LA., Dourmishev AL., Palmeri D., et al (2003) Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:175–212
247). Lisco A., Barbierato M., Fiore J., et al. (2006) Pregnancy and Human Herpesvirus 8 Reactivation in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Women. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. p. 3863–3871 Vol. 44, No. 11
248). Lampinen TM., Kulasingam S., Min J, et al. (2000) Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oral and genital secretions of Zimbabwean women. J. Infect. Dis. 181:1785–1790
249). Di Stefano M., Calabro` ML., Di Gangi IM., et al. (2008) In Vitro and In Vivo Human Herpesvirus 8 Infection of Placenta. PloS ONE 3(12)
250). Kundsin RB., Falk L., Hertig AT., et. al. (1987) Acyclovir treatment of twelve unexplained infertile couples. Int J Fertil 32: 200-204
251). King K., Smith S., Chapman M., et. al. (2010) Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. J Human Reproduction 25(1):52-8
252). Thomas D., Michou V., Moustakarias T., et. al. (2005) Altered Immunophenotypic Parameters in Infertile Women. Possible Role of Herpes Viremia. American Journal of Reproductive Immunology 54
253). Carp HJ., Selmi C., Shoenfeld Y, et al. (2012) The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. Journal of Autoimmunity 38(2-3):J266-74
254). Khizroeva J., Nalli C., Bitsadze V., et al (2019) Infertility in women with systemic autoimmune diseases. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 33(6):101369
255). Al-khafaji G. (2017) Molecular Study for Diagnosis of Ureaplasma parvum in Women with Recurrent Miscarriage. Obstetrics
256). Kasprzykowska U., Elias J., Elias M., et al (2014) Colonization of the lower urogenital tract with Ureaplasma parvum can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study, Arch Gynecol Obstet., 289(5), 1129-1134
257). Swidsinski A., Doerffel Y., Loening-Baucke V., et al. (2010) Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually, Gynecol Obstet Invest., 70(4), 256-63
258). Moreno I., Cicinelli E., Garcia-Grau I., et al. (2018) The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology, Am J Obstet Gynecol., 218(6), 602.e1-602.e16
259). Viksna L. (2018) "Impact of Chronically Ongoing Infections-HHV-6 and HHV-7 on the Course of Various Diseases." J Immunol Forecast; 1 (1) 1005
260). Huerta M., Tho¨nnisen J., Ko¨ditz B., et al. (2021) EBV induced loss of sperm quality. Turk J Urol. 47(4):287-292
261). Neofytou E., Sourvinos G., Asmarianaki M., et al (2009) Prevalence of human herpes virus types 1-7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. Fertil Steril 91:2487-2494
262). Alazzam M., Al-Radaideh A., Binsaif N. et al. (2022) Advanced Deep Learning Human Herpes Virus 6 (HHV-6) Molecular Detection in Understanding Human Infertility. Computational Intelligence and Neuroscience 2022(5):1-5
263). Levy R., Najioullah F., Keppi B., et al (1997) Detection of cytomegalovirus in semen from a population of men seeking infertiliry evaluation. Fertil Steril, 68:820-825
264). Bresson JL., Clavequin MC., Mazeron MC., et al (2003) Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. Hum Reprod 18:1881-1886
265). Bocharova EN., Zavalishina LE., Bragina EE., et al (2007) Detection of herpes simplex virus genomic DNA in spermatozoa of patients with fertility disorders by in situ hybridization. Dokl Biol Sci 412:82-86
266). Toyer A., Trignol-Viguier N., Mereghetti L., et al. (2012) Interest of simultaneous Chlamydia trachomatis and

Neisseria gonorrhoeae screening at the time of pre-abortion consultation, J Contraception., 86(5), 572-6
267). Berntsson M., Dubicanac L., Tunbäck P., et al. (2013) Frequent detection of cytomegalovirus and Epstein– Barr virus in cervical secretions from healthy young women. Acta Obstet Gynecol Scand 92:706–710

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

● **Публикации във връзка с дисертационния труд**

1. K. Mesechkova, Bilyana Georgieva, Ivan Sigridov, Ani Miteva, Vanyo Mitev, Albena Todorova "Bacterial and Viral Pathogens Implicated in Female Reproductive Failure Investigated on Menstrual Blood", *C. R. Acad. Bulg. Sci.* , vol. 76, no. 3, pp. 394–406, Mar. 2023. (Impact factor 0,378) Q3

2. Kremena Mesechkova, Anita Kavrakova, Bilyana Georgieva, Ivan Sigridov, Vanyo Mitev, Albena Todorova "Non-Invasive Diagnostics of Reproductive Failure with Infectious Etiology on Menstrual Tissue" J Acta Medica Bulgarica, 50 (3), 2023.

3. Kremena Mesechkova , Anita Kavrakova, Elena Todorova, Bilyana Georgieva, Ivan Sigridov, Vanyo Mitev, Albena Todorova "Role of bacterial and viral infections and co-infections in miscarriages " J Acta Medica Bulgarica, 50 (4), 2023.

● **Научни прояви във връзка с дисертационния труд**

1). Проект с №Д-209/12.12.2018г. от конкурса: „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения- 2018". Тема: „Изследване на най-честите бактериални и вирусни патогени, замесени в репродуктивни несполуки при жени върху менструална кръв, като прицелна биологична проба".- (участник: Кремена Стойчева Месечкова, докторант катедра Медицинска химия и Биохимия- МУ София).

8. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

1. Беше експериментално потвърдена биологичната проба менструална тъкан, като представителна за горен генитален тракт (ендометриум).

2. Беше предложен систематичен алгоритъм за диагностика на „скрити“ асимптоматични инфекции в женски горен генитален тракт чрез изследване на неинвазивна биологична проба: менструална тъкан и последващ терапевтичен мониторинг.

3. Беше постигната висока терапевтична ефективност и успешни естествени концепции чрез приложението на систематичния алгоритъм.

4. Молекулярно-инфектологичните данни доказаха нуждата от неинвазивен скрининг на ендометриума относно активни бактериално-вирусни инфекции и ко-инфекции асоциирани с безплодие, както и факта, че диагностиката на долен генитален тракт НЕ е показателна за общ генитален статус.

Приноси с методологичен характер:

1. Бяха въведени “know how” оптимизации за:
   - предобработка на биологична проба менструална тъкан
   - екстракция на ДНК
   - “know how” мултиплексен PCR метод за идентификация на *Chlamydia trachomatis.*