

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

\*\*\*\*\*

**КРЕМЕНА СТОЙЧЕВА МЕСЕЧКОВА**

**ИНФЕКЦИОЗНА ДИАГНОСТИКА ВЪРХУ МЕНСТРУАЛНА  
ТЪКАН ПРИ РЕПРОДУКТИВНИ ПРОБЛЕМИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд**

**за присъждане на образователна и научна степен**

**„ДОКТОР”**

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и  
информатика**

**Професионално направление: 4.3. Биологически науки**

**Докторска програма: Молекулярна биология**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

**Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн**

**София, 2023**

Дисертационният 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).

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия”, Медицински Университет - София, на 15.03.2023 г. и насочен за защита пред научно жури в състав:

1. Доц. д-р Атанаска Петрова Еленкова, дм (рецензия)
2. Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб (становище)
3. Проф. Албена Георгиева Йорданова, дб (рецензия)
4. Доц. Милена Сергеева Мурджева-Андонова, дб (становище)
5. Проф. Елена Борисова Джамбазова, дм (становище)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.11.2023 г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:**

CMV - Cytomegalovirus

EBV - Epstein-Barr virus

HHV - Human Herpes viruses

HHV-6 - Human herpesvirus 6

HHV-7 - Human herpesvirus 7

HHV-8 - Human herpesvirus 8

HSV - Herpes simplex virus

HSV1 - Herpes simplex virus type 1

HSV2 - Herpes simplex virus type 2

IVF - In vitro fertilisation

NK - Natural killer cells

PCR - Polymerase chain reaction

VZV - Varicella-zoster virus

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>6</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>7</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>10</b>
<b>ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>31</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЯ .....</b>	<b>34</b>
<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>35</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ .....</b>	<b>36</b>
<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>37</b>

## ВЪВЕДЕНИЕ

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.

Настоящият дисертационен труд се фокусира върху инфекциозната етиология на женско безплодие и предлага нов подход за неинвазивна диагностика на локализиран в горен генитален тракт ендометриални инфекции върху биологична 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.

В дисертацията бяха проведени молекулярно-инфектологични анализи за бактериално-вирусен панел (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/ parvum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV1/2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV-6*, *HHV-7*, *HHV-8*) върху 335 жени с български произход: 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, послужи за сравнителен анализ с клиничната инфертилната група, за да демонстрира възможността менструалната тъкан да се използва като неинвазивна биологична проба, аналогична като репрезентативност 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 *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* беше 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*, *Mycoplasma genitalium*, *HSV1*, *VZV* и *HHV-8*. В ендометриалните биопсии не бяха детектирани: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *HSV1/2*, *VZV* и *HHV-8*.

Освен за прицелния бактериално-вирусен панел, ендометриалните биопсии бяха тествани и за състояние на ендометриалния микробиом (аеробни, анаеробни, опортюнистични бактерии, коменсали). Анаеробна и аеробна дисбактериоза беше открита 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 инфекции в инфертилната група, изследвана с менструална тъкан (61,1%) и контролната инфертилна група, изследвана с проба от ендометриална биопсия (64,53%), демонстрират репрезентативността на неинвазивната менструална тъкан като представителна проба за горен женски генитален тракт и потвърждават възможността същата да бъде използвана вместо инвазивна ендометриална биопсия. В двете групи беше наблюдавано 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 процентови разлики в детектираните патогени, което се дължи на разнородност на извадката и анамнезата на пробандите. Докладваният отрицателен инфекциозен статус при 100% от изследваните здрави контроли, ясно сочи за значението и негативното 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 очертаване на таргетен вирусно-бактериален панел при инфертилитет и 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 неспособност. Това е от съществено значение за прилагане на нов скринингов диагностичен алгоритъм при жени с репродуктивни неспособности и провеждане на адекватна 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.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### ЦЕЛ

Проучване ролята на бактериални и вирусни патогени (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/ parvum*, *Mycoplasma 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.

### ЗАДАЧИ

- Подбор на клинични групи и изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването, съдържащи подробна медицинска информация, асоциирана с безплодие.
- Оптимизиране на молекулярно-биологична методика за изолиране на тотална ДНК от биологични проби: менструална тъкан и ендометриална биопсия.
- Въвеждане на молекулярно-биологична методика за амплификация на *Chlamydia trachomatis* и *CD housekeeping* ген.
- Определяне обща честота на инфекция с таргетния вирусно-бактериален панел в клиничните групи.
- Определяне на клинично-патологичен статус и видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/ parvum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV1/2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV-6*, *HHV-7*, *HHV-8*) в менструална тъкан от инфертилни жени (клинична инфертилна група).
- Определяне на видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/ parvum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV1/2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV-6*, *HHV-7*, *HHV-8*) в ендометриална биопсия от инфертилни жени (контролна инфертилна група).
- Определяне статус на ендометриален микробиом в ендометриална биопсия от инфертилни жени (контролна инфертилна група).
- 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.
- Обобщение и интерпретация на клиничните и молекулярно-инфектологични резултати от настоящата разработка.
- Създаване на биобанка с изолирани матрици тотална ДНК от менструална тъкан и ендометриална биопсия на жени с репродуктивни несполуки от български произход.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### МАТЕРИАЛИ

#### 1. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

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

#### 2. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Молекулярно-инфектологичните изследвания бяха проведени върху 335 жени с български произход разпределени в следните клинични групи:

**Инфертилна група** - 180 пациентки с анамнеза на безплодие, включваща: спонтанен аборт или рекурентни такива, трудности в естественото зачеване, физиологична обструкция на анатомични отдели от женския генитален тракт, вследствие на възпаление или хирургични интервенции, неуспешна асистирана репродукция, автоимунни 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 такива и липса на здравословните проблеми, свързани с безплодие, 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 бяха анализирани и подбрани с отрицателен цервико-вагинален инфекциозен статус по отношение на таргетния диагностичен панел. Целта на този селективен критерий е да елиминира опасността от цервико-вагинална контаминация на ендометриалните проби (менструална тъкан и ендометриална биопсия) и да осигури аналитична прецизност само и единствено върху горен генитален тракт.

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.

## МЕТОДИ

### 1. ПРЕДНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

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

### 2. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

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

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

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

2.3. Електрофореза в агарозен гел

2.4. Real time PCR - метод за качествен/количествен анализ

- Real time PCR амплификация на бактериални патогени:

- *Ureaplasma urealyticum*
- *Ureaplasma parvum*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma genitalium*
- *Gardnerella vaginalis*

- Real time PCR амплификация на вирусни патогени:

- *Herpes simplex virus type 1 (HSV1)*
- *Herpes simplex virus type 2 (HSV 2)*
- *Epstein-Barr virus (EBV)*
- *Cytomegalovirus (CMV)*
- *Varicella-zoster virus (VZV)*
- *Human herpesvirus 6 (HHV-6)*
- *Human herpesvirus 7 (HHV-7)*
- *Human herpesvirus 8 (HHV-8)*

- Real time PCR амплификация на ендометриален микробиом:

**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.*,

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 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 на възраст 22-49 г., разпределени в три клинични групи спрямо вида биологичен материал и анамнеза за репродуктивна несполука, включваща конкретни патологии и медицинска информация, асоциирана с безплодие (Таблица 1.).

Таблица 1. Клинични групи, участващи в проучването.

Клинична група	Диагноза:	Анамнеза:	Бр. пациенти:	Биологична проба:
<b>Инфертилна</b>	<b>Безплодие</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Рекурентни спонтанни аборти</li> <li>• Трудности в естествената концепция</li> <li>• Физиологична обструкция на анатомични отдели на женския генитален тракт, /результат от възпаление или хирургични интервенции/</li> <li>• Неуспешни IVF процедури</li> <li>• Наличие на автоимунно заболяване и/или други придружаващи заболявания и др.</li> </ul>	<b>180</b>	<b>Менструална тъкан</b>
<b>Инфертилна контрола</b>	<b>Безплодие</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единствено история на спонтанен аборт или рекурентни спонтанни аборти</li> <li>• Липса на каквито и да е допълнителни здравословни проблеми, свързани с репродуктивна несполука.</li> </ul>	<b>65</b>	<b>Ендометриал на биопсия</b>
<b>Здрава контрола</b>	Липсва проблем с безплодие	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ЛИПСВА</li> </ul>	<b>90</b>	<b>Менструална тъкан</b>

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. Ендометриалните биопсии не са рутинна опция, особено за скринингова оценка на инфекциозен статус на горен генитален тракт. Затова и с цел минимизиране на възможността за скрити недиагностицирани ендометриални инфекции 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.

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

### **Изготвяне на пациентски досиета на участниците в проучването**

Бяха изготвени подробни пациентски досиета на инфертилните български жени в извадката чрез стриктно приложение на създадената за целта анкетна карта, което допринесе за формиране на 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.

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

## **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:

### **Фенол-хлороформ метод за ДНК екстракция**

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

### **Комерсиална екстракция с AmpliSens Ecoli s.r.o Slovac republic**

За изолиране на тотална ДНК от менструални тъкани и ендометриални биопсии беше приложена екстракция с комерсиален кит- AmpliSens Ecoli s.r.o Slovak republic. Бяха спазени стриктно инструкциите за 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 Slovak 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 лизирани ендометриални клетки. Също така бяха въведени 2 допълнителни стъпки на промиване след приключване на стандартните процедури с миелни разтвори към комерсиалния кит. Допълнителните стъпки са прибавяне на 250μl 75% EtOH и последващо центрофугиране за 30секунди/10 000об двукратно.

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

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

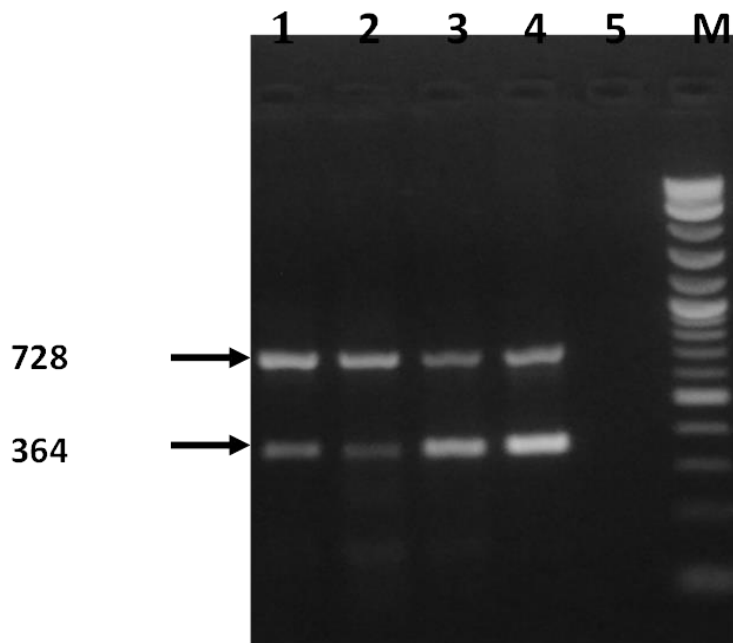
### **3. Въвеждане на молекулярно-биологична методика за амплификация на *Chlamydia trachomatis* и *CD housekeeping* ген.**

Основен мотив при дизайна на праймери за амплификация на таргетен участък от генома на *Chlamydia trachomatis* (364 б.дв.) беше постигане на най-висока чувствителност и специфичност за идентификация на патогена. След литературно проучване, анализ на бази данни и приложен виртуален PCR, се дизайнеря двойка праймери, комплементарни на специфични секвенции в криптичния плазмид *pLGV440* на *Chlamydia trachomatis*. *pLGV440* е многократно геномно амплифициран и показва много висока степен на консервативност. Тези характеристики са важни за постигане на висока аналитична чувствителност и при избор на прицелни секвенции за хибридизация на праймери в бактериални геноми с типична висока мутабилна изменчивост.

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 в обща реакция е НЕ само проверка за наличие на достатъчно клетки, но и избягване на фалшиво-отрицателни резултати вследствие PCR инхибция.

Бяха проведени оптимизации за определяне на най-подходяща температура на праймерна хибридизация чрез градиентен PCR в широк температурен диапазон (55-64 °C), с фокус към % на GC, риск от самосдвояване, праймерна димеризация, генериране на хетеродуплекси и др. Беше определена най-оптималната температура на хибридизация за двете двойки праймери 60 °C при която двата PCR продукта се намножиха отлично без неспецифични амплификати, с най-висока дискретност на фрагментите (Фиг. 1.). Беше

постигната висока диагностична ефективност за идентификация на *Chlamydia trachomatis* и генерирана окончателната оптимална PCR програма.



Фиг.1. 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/.

#### 4. Определяне обща честота на инфекция с таргетния вирусно-бактериален панел в клиничните групи.

Всички проби бяха анализирани за наличие на таргетните 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-инфектологични изследвания са съобщени в 3 публикации [1-3].

В 61,1 % от клиничната инфертилна група (180 инфертилни жени, тествани с менструална тъкан), беше детектиран позитивен инфекциозен статус за прицелния бактериално-вирусен панел (48,8 % с бактериална инфекция и 22,2 % с вирусна инфекция).

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

Здравата контролна група (90 жени без репродуктивен неуспех или заболявания, асоциирани с безплодие, тествани с менструална тъкан) демонстрира 100 % негативен по отношение на целевия диагностичен панел статус, което ясно сочи за негативно влияние на таргетните патогени върху безплодието при жени.

Сходните проценти на положителни инфекции в инфертилната група, изследвана с проба от менструална тъкан (61,1%) и в контролната инфертилна група, изследвана с проба

от ендометриална биопсия (64,53%) 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.

**5. Определяне на клинично-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).**

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

От всички позитивни за таргетните бактериално-вирусни инфекции пробанди, 49% са с история на спонтанни аборти, като 27,7% са имали единичен спонтанен аборт, а 72% => 2 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 беше наличието на история на спонтанни аборти в 64% от пробандите с негативен инфекциозен статус. Възможно е да са били с положителен инфекциозен статус при 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. В групата на инфектираните пациенти с история на спонтанни аборти 33,3% са диагностицирани с автоимунни заболявания, докато в групата с трудности в забременяването - 7,14% (Таблица 2.).

Различни придружаващи заболявания (преобладаващо асоциирани с безплодие) са докладвани при 13,8 % от всички изследвани пациенти с репродуктивни проблеми в клиничната инфертилна група. 15,5% от цялата група са активни пушачки, но 11,1 % от тях са съсредоточени именно в позитивните за инфекции пробанди.

**Таблица 2. 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 %

**Видово-специфична честота на разпространение на бактериални и вирусни инфекции в позитивната извадка на инфертилната клинична група.**

Честотите на разпространение на активна инфекция с бактериалните и вирусни патогени, (изчислени процентно от всички позитивни бактериални и вирусни случаи) са представени в Таблица 3.

**Таблица 3. 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 %
<i>Ch.tr.</i>	0	0 %
<i>MHO</i>	2 (88)	2,27 %
<i>MGE</i>	0	0 %
<i>UUR</i>	2 (88)	2,27 %
<i>UP</i>	54(88)	61,36 %
<i>GV</i>	61(88)	69,31 %
<i>HSV1</i>	0	0 %
<i>HSV2</i>	1 (40)	2,5 %
<i>EBV</i>	16 (40)	40 %
<i>CMV</i>	3 (40)	7,5 %
<i>VZV</i>	0	0 %

<i>HHV-6</i>	4 (40)	10 %
<i>HHV-7</i>	17 (40)	42,5 %
<i>HHV-8</i>	0	0 %
Бактериална инфекция	88 (110)	80 %
Вирусна инфекция	40 (110)	36,3 %

Беше установено състояние на ко-инфекция при 39,9 % от всички позитивни за инфекции случаи. Най-честите варианти 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*.

### Интерпретация и обобщение на молекулярно-инфектологичните данни при инфертилна клинична група.

*Chlamydia trachomatis* НЕ беше детектирана в прицелната ни извадка пробанди, което е в противоречие с данните за преобладаващо разпространение на гениталните инфекции с *Chlamydia trachomatis* [7-8].

В настоящето проучване, докладваните данни се обясняват с подбора на пробанди с отрицателен цервико-вагинален статус по отношение на *Chlamydia trachomatis*, което гарантира липсата на контаминация на менструалната тъкан. Подобен селективен критерий липсва в почти всички други проучвания.

Друга причина за наблюдаваното различие е, че 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.

Съществен момент за установеното несходство в резултатите е и получената от нас анамнеза за провеждано антибиотично лечение при голяма част от пациентите 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 и 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 неспособност в тези случаи е комплексна и в заключение инфекциозната етиология има дългосрочно 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 u Ureaplasma urealyticum** бяха детектирани в 2,27 % от бактериално заразените менструални тъкани (Таблица 3.), което не съвпада с резултатите 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* [7]. Докладваният процент на *Ureaplasma urealyticum* при 37,5% позитивни стерилни жени и 17,2% при жени, претърпели *in vitro* плождане в литературата, превишава значително детектираната честота в настоящата дисертация 2,27% (Фиг. 2.) [9-10]. Детектираните честоти на *Ureaplasma urealyticum* 54,3% и *Mycoplasma hominis* 30,4 % при безплодни пациентки, хоспитализирани поради аборт, както и *Ureaplasma urealyticum* (25%) и *Mycoplasma hominis* и *group B Streptococcus* (11,1%) в гестационни постабортивни тъкани на Tavo, Allanson и група не съвпадат с докладваните данни в разработката [11-12].

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

Литературните данни за сравнение идват предимно от долен генитален тракт, макар и при жени с репродуктивна неспособност, което е в противоречие с нашата теза и изследване върху проби от менструална тъкан и ендометриална биопсия. От друга страна, в публикациите с изследвания, проведени върху горен генитален тракт липсва определяне на долен генитален инфекциозен статус, което вероятно завишава публикуваните честоти, поради контаминация на менструалните проби от влагалище.

Известната висока влагалищна честота на генитални микоплазми и рискът от контаминация на ендометриалните проби, предопредели в клиничните групи на настоящето проучване да бъдат включени единствено жени с отрицателен влагалищен инфекциозен статус по отношение на *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* и останалите таргетни патогени. Такава специфика представлява своеобразно сито и пречиства извадката ни по отношение на данни за долен генитален тракт, което би било в противоречие с оценка пряката връзка генитални микоплазми - безплодие.

### **Mycoplasma genitalium**

Инфекция с *Mycoplasma genitalium* не беше открита в проучването.

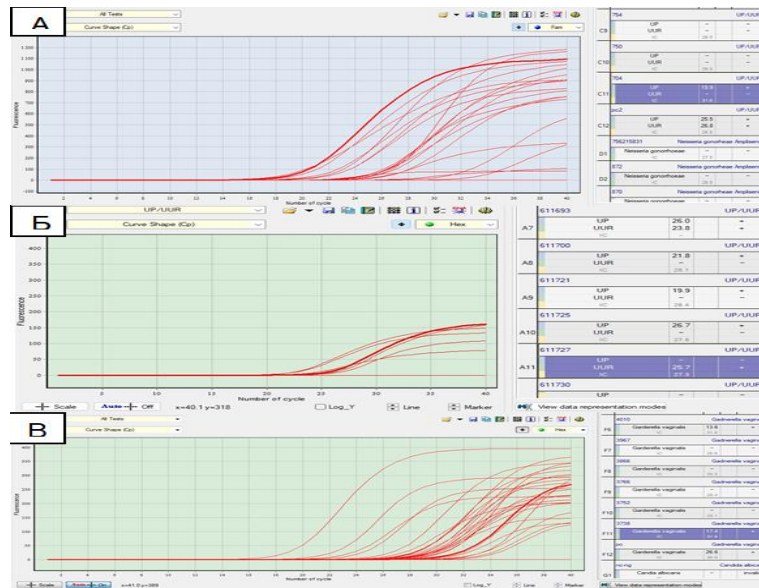
Негативният статус на изследваните менструални тъкани и ендометриални биопсии относно *Mycoplasma genitalium* е нормално, тъй като този патоген е типично полово-предавана бактерия, а пробандите са многократно тествани за такива инфекции по пътя на репродуктивните си проблеми.

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 [13].

Важна характеристика е липсата при изследваните пациентки на патологични състояния - тазово-възпалителна болест и клиничен цервицит, при които се докладват значително по-висока честота на инфекция с бактерията [14-15]. Тази специфика и ниската честота на *Mycoplasma genitalium* 4-5,9 % от големи "case-control" изследвания сочат за съвсем нормална липсата на *Mycoplasma genitalium* при 180 инфертилни български пациентки.

### **Ureaplasma parvum**

Позитивен инфекциозен статус на менструалните тъкани за *Ureaplasma parvum* беше установен при 30 % от изследваните пробанди или 61,36 % от всички положителни бактериални проби (Фиг. 2).



**Фиг. 2. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна инфекция с:**  
**A. *Ureaplasma urealyticum***  
**B. *Ureaplasma parvum*.**  
**C. *Gardnerella vaginalis*.**

Идентифицираната колонизация с *Ureaplasma parvum* в плацента, амниотична течност, фетална кръв и пъпна връв, фетален и неонатален бял дроб, цереброспинална течност, както и в гастро-интестинални аспирати сочи лесната масирана инвазия на патогена в тъканите на женския генитален тракт, както беше наблюдавано в настоящето проучване по отношение на ендометриума [16-21]. 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 [22].

Получените резултати в изследването подкрепят заключението от други клинични проучвания, че инфекцията с *Ureaplasma parvum* в плацента и ендометриум се свързва с мъртво раждане, спонтанни аборти, преждевременно раждане и понижено тегло на новородените. Всички тези варианти, резултиращи в безплодие присъстват в анамнезата за репродуктивна несполука на позитивните за *Ureaplasma parvum* пробанди с инфектирани менструални тъкани. Настоящите данни относно високия дял на позитивни за *Ureaplasma parvum* безплодни жени с анамнеза за рекурентни спонтанни аборти корелират с литературните, според които бактерията се изолира по-често от пациенти с анамнеза за повтарящи се спонтанни аборти, отколкото от нормални бременни и небременни жени [23].

Някои пробанди, заразени с *Ureaplasma parvum/urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* нямат физиологични обструкции или усложнения на гениталния тракт. При тях вероятно безплодието е функция от директно инфектиране на зиготата от заразен сперматозоид, а положителния инфекциозен ендометриален статус е скоро настъпило събитие, което все още не е предизвикало възпалителни усложнения. Настоящите наблюдения потвърждават хипотезата за бактериална инвазия, осъществена чрез

вертикалната трансмисия, посредством фактора на инфекцирана семенна течност, което съвпада с литературата [24].

Въпреки многократно доказаната причинно-следствена връзка на инфекцията с *Ureaplasma parvum* със сериозни репродуктивни проблеми, няма 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 мембраните, преждевременно раждане, фетален инфламаторен синдром, фетална смърт) правят още по-ценна възможността за неинвазивен скрининг чрез менструална тъкан.

### **Gardnerella vaginalis**

В 33,8 % от инфертилната клинична група беше детектирана позитивна инфекция с *Gardnerella vaginalis* (69,31 % от всички позитивни бактериални менструални тъкани). Високото и разпространение потвърждава връзката между провъзпалителното състояние на ендометриума и неблагоприятния изход от бременността, посредством клиничните данни на инфектираните пациентки (предимно биохимични концепции, ранни и късни спонтанни аборти и едно мъртво раждане).

Високият процент на *Gardnerella vaginalis* в ендометриални тъкани (Фиг. 2.) и липсата му в контролните влагалищни проби презентира асцендентния характер на този микроорганизъм, в резултат на *Gardnerella vaginalis*- асоциирана бактериална вагиноза в миналото. 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, каквато е хипотезата за част от инфертилната клинична група [25].

Колонизацията на ендометриума с *Gardnerella vaginalis* повлиява неблагоприятно изхода на бременността, което се потвърждава в извадката инфертилни жени с масово инфектирани менструални тъкани. Текущите данни съвпадат с докладваната *Gardnerella vaginalis*- доминираща ендометриална колонизация и липса на паралелна инфекция с други патогени, което подсказва автономното негативно въздействие на *Gardnerella vaginalis* върху фертилните параметри [26]. Масовата бактериална инвазия в извадката сочи ендометриалната колонизация и последваща провъзпалителна реакция и имунен дисбаланс, като водещ механизъм при случаи на компрометирано забременяване, неуспешна имплантация, спонтанен аборт и преждевременно раждане в изследваните пробанди, което се съобщава и от редица други екипи [27].

Докладваните данни за наличие на 53,48% ко-инфекция *Gardnerella vaginalis/Ureaplasma parvum* в инфектираните менструални тъкани, но чист цервико-вагинален статус, директно потвърждават тропизма на патогените към горен генитален тракт. Разбира се хипотезата за директна вертикална трансмисия към ендометриума посредством инфекцирана семенна течност е напълно приемлива.

### **HHV-6**

Честотата на HHV-6 е 10% в инфертилната клинична група, като е значително по-ниска спрямо литературните данни, докладващи 40 % позитивни случаи при жени с идиопатично безплодие (Фиг. 3.).

Счита се, че именно HHV-6 инфекцията на ендометриалните епителни клетки, която доказано нарушава децидуализацията [35], е свързана с някои от случаите на спонтанни

аборти на пробанди, инфектирани с вируса в настоящата извадка. Вероятно е *HHV-6* да е понижил експресията на маркери за децидуализация (*HLA-G23*, *MUC1*), критични за диференциацията на ендотелните клетки, имплантацията, ангиогенезата, трофобластния клетъчен растеж и имунна регулация по време на ранна бременност, както се докладва [35-36].

Вirusът *HHV-6* не влияе върху спермалните параметри, но се докладва в 70% при мъже с нормална спермограма и 66,3% при мъже с флукутации, което сочи вертикалната трансмисия чрез партньора, като главен начин за заразяване на женски ендометриум [37].

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

### *HHV-7*

В инфертилната клинична група беше детектирана позитивна инфекция с *HHV-7* в 42,5 % от случаите, което е най-високата честота от всички позитивни за *HHVs* менструални тъкани (Фиг. 3.). Изненадващите данни предполагат потенциална връзка между активната асимптоматична инфекция с *HHV-7*, като фактор и/или ко-фактор в женския ендометриум и сложната клинична картина на идиопатично женско безплодие.

Подобни данни са значими, тъй като *HHV-7* е морфологично подобен на *HHV-6*, който е с доказан негативен ефект върху репродукцията, а двата вируса участват едновременно в патогенезата на други заболявания [28].

Почти 100% от населението е заразено с *HHV-7* по време на ранна детска възраст и доказано остава в латентно състояние след това. Като логична хипотеза за установената сигнификантна честота на *HHV-7* в инфектираните менструални тъкани на безплодните пробанди се приема претърпяна реактивация вследствие на хормонални и алтернативни екзо и/или ендогенни стимули. Предвид липса на негативно влияние чрез *HHV-7* върху сперматогенезата и спермалните параметри и отсъствието му в семенна течност, хипотезата за вертикална трансмисия чрез инфектирани сперматозоиди НЕ важи.

Данните за ролята на *HHV-7* в безплодието са оскъдни, недостатъчни и епизодични. Макар, че има данни 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 връзка с анамнеза на безплодие.

### *CMV*

Сред многото вирусни фактори с роля в загубата на бременност, се счита, че майчините инфекции, причинени от *CMV* и *EBV* са съществени. Предвид данни за масирани плацентарни инфекции с *EBV* 22,5 % и *CMV* 30% при жени с рекурентни аборти (доказано чрез имунохистохимия и “in situ” хибридизация [31]), категорично не се изключва такъв вариант за настоящата извадка български жени. Плацентарното инфектиране с *EBV* и *CMV* се извършва посредством маточната кухина на бременната жена, респективно ендометриум.

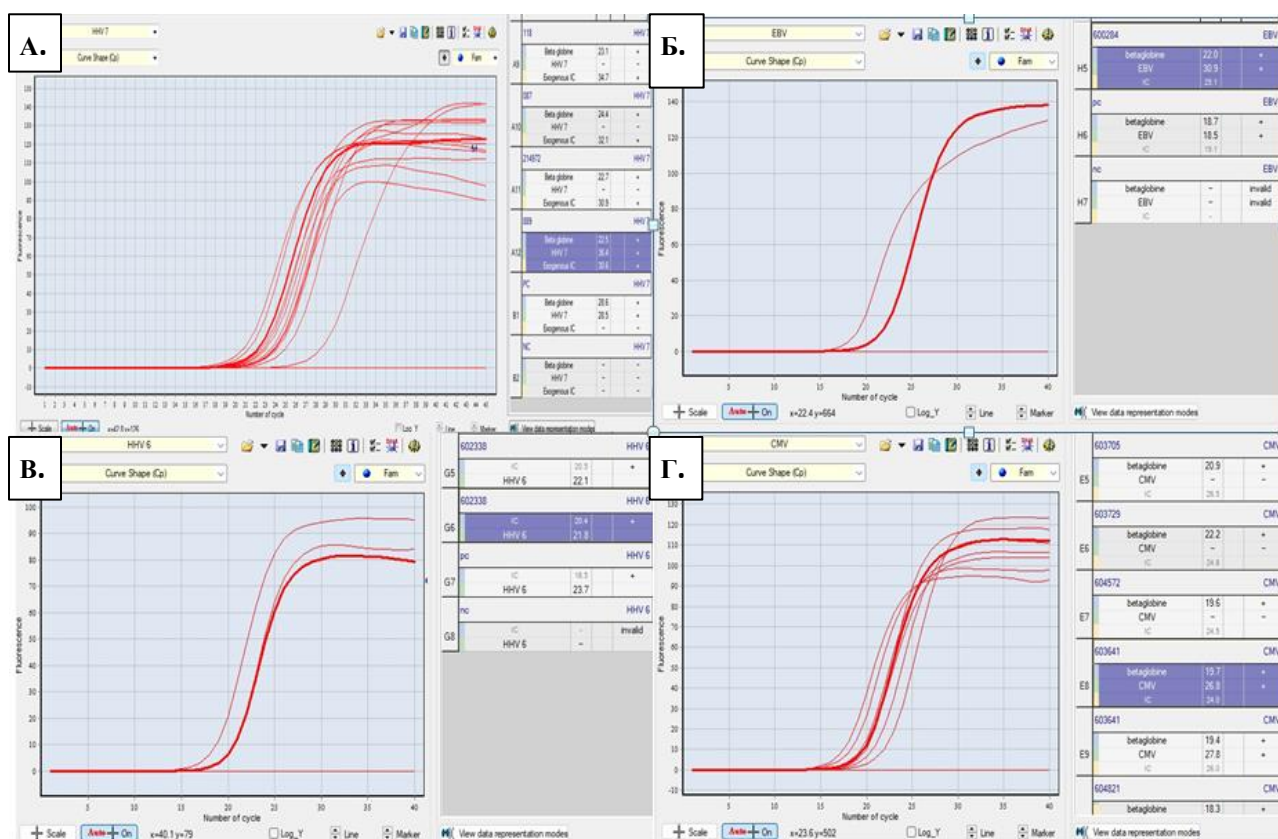
Детектираната в инфектирани менструални тъкани честота на *CMV* 7,5 % кореспондира с докладваната 11, 5 % в цервикални проби и плацентарни тъкани (Фиг. 3.) [31]. *CMV* успешно набогатява ендометриума и плацентата по време на бременност, реплицирайки се в трофобластни, епителни, стромални клетки, макрофаги и фетални тъкани. При инфектиран с *CMV* ендометриум следва масирана вирусна инвазия към

изброените отдели и спонтанна загуба на бременност в резултат на възпалителен отговор, което може да е причина за неблагоприятен изход и в анализирания група [38].

Освен механизъм на цервикално реактивиране и асцендиране на инфекцията към ендометриум, алтернативен вариант за ендометриална *CMV* колонизация е чрез зарамена семенна течност [39-40]. Теорията се подкрепя и чрез докладваната по-висока честота на *CMV* в семенната течност на партньорите на пациентки с история на рекурентни спонтанни аборти спрямо контролната група ( $p < 0,05\%$ ) [41].

### EBV

Детектираната честота на EBV в инфектираните менструални тъкани е значителна - 40 % (Фиг. 3.) и съвпада с публикуваните данни за разпространение на EBV (предимно в ендцервикални проби) от 8,9 % в шведска извадка, 18-19% при италиански пациентки до 38 % отново при европейски жени [29-30].



**Фиг. 3. Положителен резултат от Real-Time PCR за клинично значима активна инфекция с:**

**A. Human herpesvirus 7 (HHV-7)**

**Б. Epstein-Barr virus (EBV)**

**В. Human herpesvirus 6 (HHV-6)**

**Г. Cytomegalovirus (CMV)**

Поради високата честота на EBV 40 % в менструалните тъкани, кореспондираща с научните данни, се приема, че ендометриума на инфертилните пробанди е набогатен с

патогена и има съществена роля в случаите на рекурентни аборти или най-ранни такива, свързани с имунологично отхвърляне и нарушена имплантация.

Ендометриалната колонизация с *EBV* е функция на реактивирана латентна инфекция или вътрематочна трансмисия чрез инфектирани сперматозоиди. Потенциалната вертикална трансмисия чрез партньора, застъпена и в настоящата извадка се подкрепя чрез доказателства за *EBV* ДНК в семенна течност на инфертилни мъже в 0,4% , 16,8%, 40,6% и индуцирана левкоцитоспермия [32-34].

### HSV1/2

В изследваната група пробанди HSV2 беше детектиран с минимална честота 2,5 % (Таблица 3.), като позитивните пациентки имат анамнеза за ранни спонтанни аборти.

Получените резултати не съвпадат с публикуваните данни за наличие на ДНК на *HSV1/2* в менструална тъкан при 55% жени и при 24% мъже с безплодие и неуспешни IVF процедури ( $p = 0,0086$ ) [42].

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 [43-45]. 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 [46].

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 %. 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.

**6. Определяне на видово-специфична честота на инфекция/ко-инфекция с таргетните за проучването микроорганизми (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, *Mycoplasma 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 от инфертилни жени, тествани за таргетния инфекциозен панел върху биологичен материал ендометриална биопсия се състои от 65 пациентки (22-49г.). Бяха селектирани на база история на ранни и/или късни повтарящи се аборти, липса на автоимунни и други заболявания, асоциирани със стерилитет. Негативният статус по отношение на целевия бактериално-вирусен панел в долен тракт също беше селективен критерий в тази група.

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 таргетния бактериално-вирусен панел (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV1/2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV-6*, *HHV-7*, *HHV-8*). Не беше ползвана здрава контролна група поради инвазивния характер на пробовземане на ендометриалната биопсия.

Честотите на детектираните бактериални и вирусни инфекции, изразени процентно спрямо всички бактериално и вирусно инфектирани пробанди са посочени в Таблица 4. Инфекции с *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *HSV1/2*, *VZV* и *HHV-8* не бяха детектирани.

Таблица 4. 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
<i>EBV</i> *	30%	---
<i>CMV</i> *	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>CMV</i> + умерено изявена аеробна дисбактериоза и доминираща бактериална фракция: <i>Streptococcus spp.</i></li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>CMV</i> + дисбактериоза със смесена етиология: <i>Lachnobacterium spp.</i> + <i>Clostridium spp.</i>, <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Streptococcus spp.</i></li> </ul>
<i>HHV-6</i> *	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>HHV-6</i> + силно изявена анаеробна дисбактериоза с доминираща бактериална фракция: <i>Eubacterium spp.</i></li> </ul>
<i>HHV-7</i> *	20%	---
<i>Gardnerella vaginalis</i> *	31,25%	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Gardnerella vaginalis</i> (доминираща) + анаеробна дисбактериоза: <i>Prevotella bivia</i>, <i>Porphyromonas spp.</i></li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Gardnerella vaginalis</i> (доминираща) + анаеробна дисбактериоза: <i>Mobiluncus spp.</i>, <i>Corynebacterium spp.</i>, <i>Eubacterium</i>, <i>Atopobium vaginae</i></li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Gardnerella vaginalis</i> (доминираща) + аеробна дисбактериоза: <i>Staphylococcus spp.</i>, <i>Enterobacteriaceae spp.</i></li> </ul>

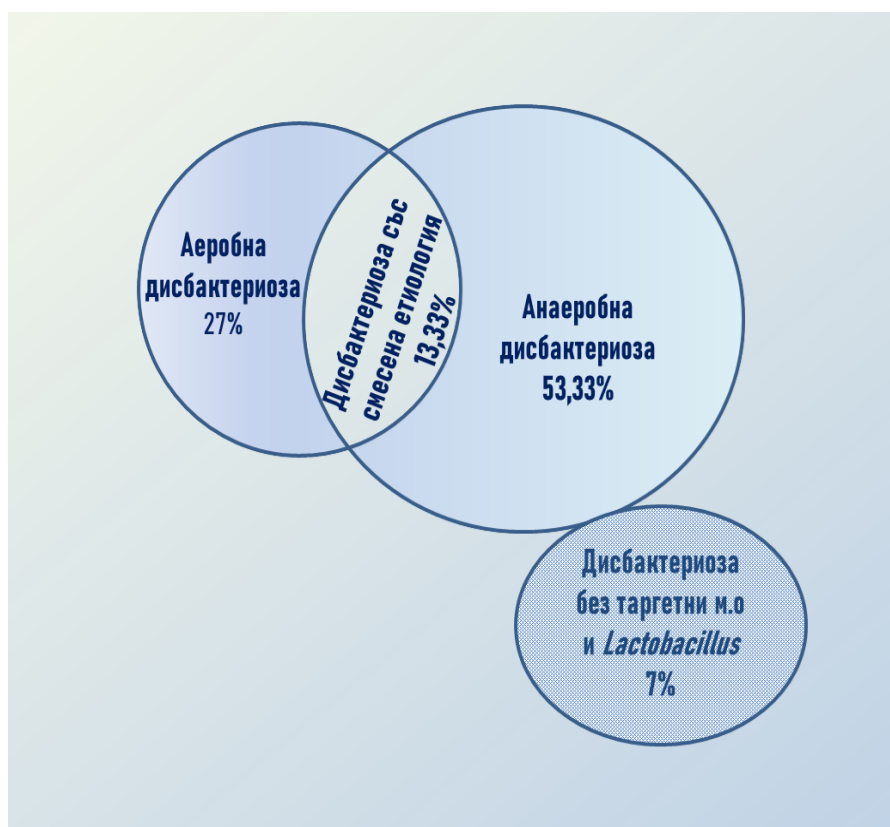
<i>Ureaplasma parvum</i> *	3,12%	---
----------------------------	-------	-----

\*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.

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

Освен за прицелния бактериално-вирусен панел, ендометриалните биопсии бяха тествани за оценка на ендометриален статус (анаеробни, аеробни бактериални и коменсална фракция микроорганизми). По този начин се определи честотата на ендометриална дисбиоза 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. 5.).

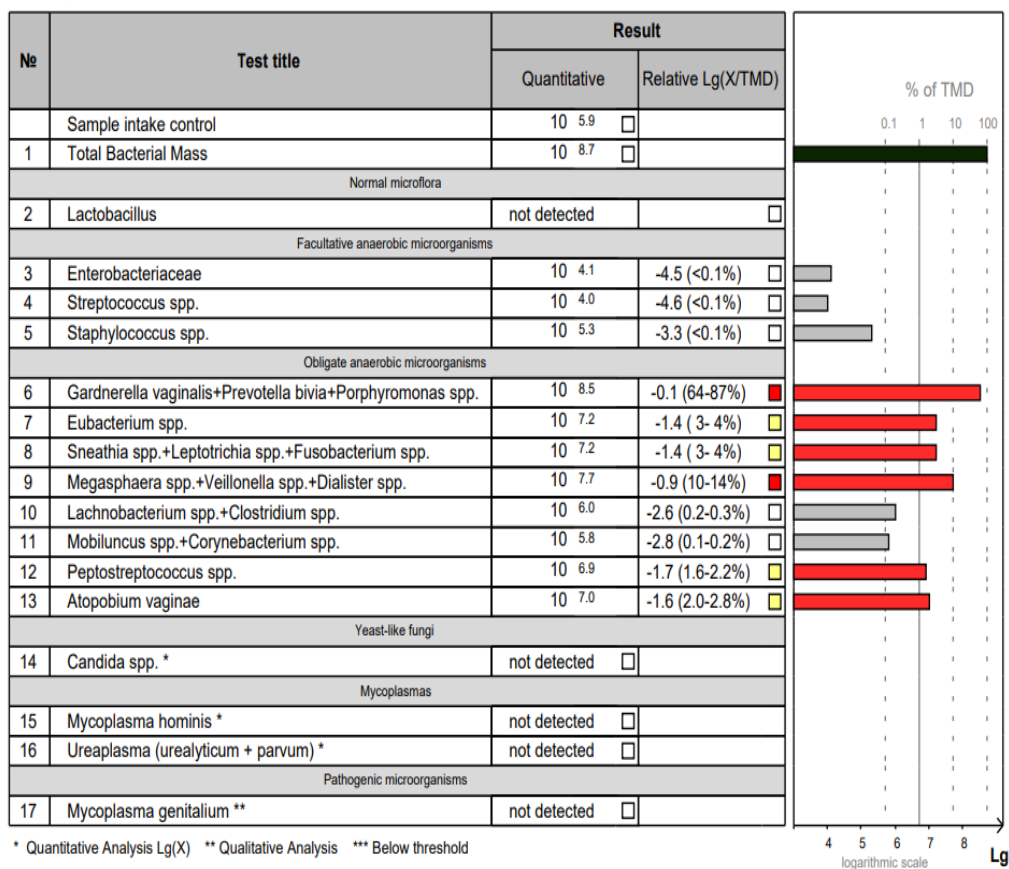


Фиг. 5. Типове дисбактериоза, като следствие от небалансиран бактериален растеж, ендометриална колонизация и последващо възпаление.

- **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.*

Детектираните анаеробни и аеробни бактерии в ендометриалните биопсии корелират с резултатите от високотехнологични изследвания върху ендометриалния микробиом [47-48]. 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 6.). *Staphylococcus spp.* и *Enterobacteriaceae spp.* се открива предимно в случаите на аеробна дисбактериоза.

Sample ID: 604928



**Conclusion:**

Apparent Anaerobic dysbiosis

**Фиг. 6.** Анаеробна дисбактериоза с доминираща бактерия *Gardnerella vaginalis* в комбинация с *Prevotella bivia*, *Porphyromonas spp.* Тотална липса на коменсална фракция: *Lactobacillus*.

Дисбиотичните състояния в проучването се характеризират с намаляващия дял на р. *Lactobacillus* в различна степен, както се съобщава и в литературата [49]. Екипи с фокус бактериални взаимодействия доказват, че р. *Lactobacillus*, обединяващ коменсални

миктоорганизми е отрицателно свързан с *Gardnerella*, *Bifidobacterium* и *Atopobium* [48], което важи за *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 важноста от извършване на изследването върху ендометриална проба (менструална тъкан или биопсия).

## **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). 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 бактериална 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 5.).

Таблица 5. 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)	100 %	0%
Инфертилна с ендометриална биопсия (65)	35,47%*	64,53%* (49,23 бактериални и 15,3% вирусни)

(\*)- Висока степен на корелация относно отрицателен/положителен инфекциозен статус между инфертилна клинична и инфертилна контролна група.

По-ниската честота на *Gardnerella vaginalis* в ендометриалните биопсии 31,25% в сравнение с менструалната тъкан 69,31% се счита за нормална находка, предвид големината и разнородност на извадката. Групата с ендометриалните биопсии (65) се приема за относително малка в сравнение с броя изследвани менструални тъкани (180). Също, при ендометриалните биопсии има положителна анамнеза единствено за рекурентни аборти, докато при менструалните тъкани се включва голямо разнообразие от репродуктивни и асоциирани с безплодие здравословни проблеми. Предполагаме, че при нарастване на контролната инфертилна група, като големина и разнородност статистиката ще се промени.

Друга съществена причина за наблюдаваните разлики е, че при контролната инфертилна група ~ 50% от половите партньори на селектираните пациентки са тествани и са отрицателни 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 в 3,12% от всички бактериално инфектирани ендометриални биопсии, което е изключително нисък процент спрямо данните от менструална тъкан – 61,36%.

Възможни обяснения за ниската честота на *Ureaplasma parvum* в контролната група са отново: отрицателен статус за бактериалните патогени в ~ 50% от половите партньори на пробандите, обем и анамнеза на извадката, строги критерии за включване в изследването.

*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis/genitalium* и *Ureaplasma urealyticum* не бяха открити в ендометриалните биопсии, което не потвърждава публикуваните данни [50]. От друга страна *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* бяха открити с много ниска честота (2,27%) в менструални тъкани. 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 вируси ендометриални биопсии и в 40%, 7,5%, 10% и 42,5% от менструалните тъкани (Таблица 6.). Тези разлики се дължат вероятно на по-малкия брой изследвани ендометриални биопсии (65) в сравнение с менструалните тъкани (180). Ако извадката с ендометриални биопсии нарасне е възможно да получим по-сходни резултати. 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 6. Сравнителен анализ от приложението на прицелния инфекциозен панел в клинична и контролна инфертилна група

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

<i>Gardnerella vaginalis</i>	69,31%	31,25%	Разлика в извадка Негативен вагинален статус Негативен партньор
------------------------------	--------	--------	--

Докладваните резултати хипотезират различна асоциативност на определени инфекции с конкретни репродуктивни разстройства. Така например, много по-високият процент на *CMV* в ендометриални биопсии (40%) спрямо (7,5%) в положителни менструални тъкани подсказва, че вероятно *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 проблеми, свързани с проблемна концепция, отколкото с аборт. Има необходимост от бъдещи проучвания в подкрепа на констатираните тенденции, асоциации и мултифакторни констелации.

В допълнение половите партньори на инфертилната контролна група пациентки не са скринирани за вирусните таргетни патогени. Това създава допълнителна предпоставка за вирусна трансмисия към горен генитален тракт 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 менструална тъкан на инфектираните безплодни пробанди беше регистриран само *HSV2* в 2,5 %. Установените резултати кореспондират с литературни данни за ниска честота на *HSV1/2* инфекция (1,4%-1,7%) и тотална липса на *VZV* в ендоцервикални секрети на асимптомни пациентки [51]. В същото време *HSV1/2* се докладват в много по-висок процент 55% в менструални тъкани на безплодни жени в пилотно изследване на El Borai, което противоречи на настоящите резултати [42]. Трябва да се отчете факта, че в цитираното изследване върху менструална тъкан, повечето 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 им със спонтанни аборти и перинатална инфекция. Логично е да липсват и в двете клинични групи, защото разпространението им е географски и културално стратифицирано. Нормално е при съвременни български европейски жени с достъп до ваксини и превенция да не се детектират. 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 аномални спермални параметри.

**Съществен момент от проучването е паралелното изследване на 15% от пациентките чрез менструална тъкан и ендометриална биопсия. Наблюдаваните отрицателни или положителни бактериално-вирусни находки бяха абсолютно идентични и в двата типа проби.**

Докладваната 100% съпоставимост на молекулярно-инфектологичните резултати в споделената извадка пациенти, тествани с двата типа проби е

**впечатляваща. 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 бактериално-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 находки за ендометриален полип от хиперпластичен тип от медицинските ни колаборатори. При тези пациенти лечението продължава във вярната посока.**

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.

## **9. 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 дисертацията 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 °С 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 °С), 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 °С 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 *nanodrop* апарат. След това беше проведен PCR за намножаване на ендогенната вътрепна контрола *CD*.

## ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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.

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.

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*, *Mycoplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV1/2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV-6*, *HHV-7*, *HHV-8*). Изследваните 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 безплодни жени (180), тествани с менструална тъкан, беше детектиран позитивен инфекциозен статус за прицелния бактериално-вирусен панел (48,8 % от всички изследвани проби с бактериална и 22,2 % с вирусна инфекция).**

Контролната инфертилна група, представена от 65 пациента с ендометриална биопсия, демонстрира 64,53% позитивни случаи (49,23% с бактериална и 15,3% с вирусна инфекция). Контролната инфертилна група 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 инфекции в инфертилната група (61,1%), изследвани с проба от менструална тъкан и (64,53) в контролната инфертилна група, изследвани с проба от 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 локализиран патогени демонстрира възможността от инфекция на горен генитален тракт при неинфектиран долен и докладва необходимостта от задължителна целева инфекциозна диагностика на горен генитален тракт. За целта излъчването на неинвазивна проба, репрезентативна за горен генитален тракт, е ключово в обособяването на диагностичния 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*. Ендометриалните биопсии бяха допълнително оценени за състоянието на ендометриалния микробиом. Анаеробна и аеробна дисбактериоза бяха установени 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 настоящето проучване не припокри напълно докладваната според литературните данни, което намира обяснение в подбора на пациенти с отрицателен цервико-вагинален статус. Негативният статус на нашите пробанди за инфекции на долен генитален тракт изключва контаминация привнесена от този отдел. Липсата на подобен критерий в докладваната в литературата честота на бактериална 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* и др. Популационни характеристики също имат значение. 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 проблеми, свързани с концепцията.

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 ендометриални биопсии. В двете групи наблюдавахме абсолютно съвпадение в

процента на пациенти с положителен инфекциозен статус и разпределението им спрямо 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 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.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mesechkova et al. (2023) C. R. Acad. Bulg. Sci. , vol. 76, no. 3, pp. 394–406.
2. Mesechkova et al. (2023) J Acta Medica Bulgarica /in press/
3. Mesechkova et al. (2023) J Acta Medica Bulgarica /in press/
4. Carp et al. (2012) Journal of Autoimmunity 38(2-3):J266-74.
5. Khizroeva et al. (2019) Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism; 33(6):101369.
6. Walker et al. (2022) StatPearls Publishing.
7. Michou et al. (2014) J Obstet Gynaecol Res; 40(1):237-42
8. Low et al. (2004) Euro Surveill Volume 8, Issue 41
9. Mousavi et al. (2014) Iranian J of Microbiology 6(6): 398–403.
10. Witkin et al. (1995) J Assist Reprod Genet, 112: 610–614.
11. Tavo et al. (2013) Med Arch; 67:25.
12. Allanson et al. (2010) Aust N Z J Obstet Gynaecol; 50:221–225.
13. Lis et al. (2015) Clin Infect Dis 2015; 61:418–26.
14. Manhart et al. (2003) J Infect Dis 2003; 187:650–7.
15. Bjartling et al. (2010) BJOG; 117:361–4.
16. Kasper et al. (2010) Diagn Microbiol Infect Dis 67: 117–121.
17. Crouse et al. (1993) Clin Infect Dis 17 Suppl 1: S122–130.
18. Viscardi et al. (2006) Pediatr Dev Pathol 9: 143–151.
19. Viscardi et al. (2008) J Perinatol 28: 759–765.
20. Sanchez et al. (1990) J Pediatr Infect Dis J 9: 398–401.
21. Oue S et al. (2009) J Dis Child Fetal Neonatal Ed 94: F17–22.
22. Al-khafaji G. (2017) J Obstetrics.
23. Kasprzykowska et al. (2014) J Arch Gynecol Obstet., 289(5), 1129-1134.
24. Gdoura et al. (2007) J BMC Infect; 7:129.
25. Swidsinski et al. (2010) J Gynecol Obstet Invest., 70(4), 256-63.
26. Moreno et al. (2018) Am J Obstet Gynecol., 218(6), 602.e1-602.e16.
27. Kamiyama et al. (2004) J Fertil Steril., 82(4), 788-92.
28. Viksna et al. (2018) J Immunol Forecast; 1 (1) 1005.
29. Enbom et al. (2001) J Sex Transm Dis; 28:300–6.
30. Haeri et al. (2010) Am J Perinatol; 27:715–19.
31. Bayati et al. (2017) J Biomedical & Pharmacology Journal Vol. 10(1), 221-229
32. Bezold et al. (2007) J Fertil Steril; 87:1087–97.
33. Bezold et al. (2001) J Fertil Steril 2001; 76:416–8.
34. Huerta et al. (2021) Turk J Urol.; 47(4):287-292.
35. Bortolotti et al. (2019) Am J Reprod Immunol. 2019; 82:e13174.
36. Rizzo et al. (2011) J Cell Mol Life Sci. ;68(3):341-352.
37. Neofytou et al. (2009) J Fertil Steril 2009, 91:2487-2494.
38. Chou et al. (2006) Am J Obstet Gynecol 2006;194:535–541.
39. Levy et al. (1997) J Fertil Steril 68:820-825.
40. Bresson et al. (2003) J Hum, 18:1881-1886.
41. Bocharova et al. J Dokl Biol Sci 2007, 412:82-86.
42. El Borai et al. (1997) J Obstetr Gynaecol Res 23: 17-24,.
43. Yamada et al. (2001) Am J Reprod Immunol 46: 132-136.
44. Kokawa et al. (1998) J Placenta 19: 21-26.
45. Sutherland et al. (1997) J Proc Natl Acad Sci USA 94: 13510-13514.
46. Kapranos et al. (2003) J Fertil Steril 79(Suppl): 1566-1570.
47. Moreno et al. (2016) Am. J. Obstet. Gynecol; 215, 684–703.
48. Moreno et al. (2022) Microbiome; 4;10(1):1.
49. Winters et al. (2019) J Sci. Rep., 9, 9905.
50. Toyer et al. (2012) J Contraception., 86(5), 572-6.
51. Berntsson et al. (2013) J Acta Obstet Gynecol Scand 2013; 92:706–710.

## ИЗВОДИ

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.
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).
3. Сравнителният анализ върху честотата и анамнезата на прицелните бактериално-вирусни патогени в проучването доказва асоциацията на *Ureaplasma parvum*, *Gardnerella vaginalis*, *HHV-6*, *CMV*, *EBV*, *HSV2* с безплодие, като внуши евентуална връзка вид патоген с тип клинично-патологична находка.
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. Високата честота на *HHV-7* в менструална тъкан /ендометриална биопсия (42,5%/ 20%) и оскъдните научни данни, предопределя потенциалната асоциация на асимптоматична ендометриална инфекция с *HHV-7* с репродуктивна несполука.
6. Данните за ендометриален микробиом в ендометриални биопсии доказаха драстична разлика в долен генитален тракт: цервико-вагинална нормоценоза, контрастираща с масова ендометриална дисбиоза.
7. Установеният различен инфекциозен статус в горен и долен генитален тракт разкриват необходимостта от паралелна диагностика върху проби с цервико-вагинален и ендометриален произход.
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).
9. Високата терапевтична ефективност и реализирана 97% естествена концепция след изчистване на горен гнитален тракт от бактериално-вирусни инфекции в ендометриални биопсии, недвусмислено доказва нуждата от инфекциозен скрининг в ендометриум.
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.

## 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).

## 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 РСР метод за идентификация на *Chlamydia trachomatis*.