

На правах рукописи

Джайн Марк

**ЦИТОКИНОВОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ
МЕНСТРУАЛЬНОЙ КРОВИ В ОЦЕНКЕ РЕЦЕПТИВНОСТИ
ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ БЕСПЛОДИИ**

3.3.8 — клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Кандидат медицинских наук, доцент

Самоходская Лариса Михайловна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, член-корр. РАН **Свитич Оксана Анатольевна**
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», директор.

Доктор медицинских наук

Болдырева Маргарита Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства России, лаборатория генетики и гистосовместимости человека, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2023 года в 14 часов на заседании Диссертационного Совета 21.2.058.04 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1; и на сайте: www.rsmu.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Кандидат медицинских наук, доцент

Демина Ольга Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Бесплодие определяется как невозможность зачатия в течение 1 года регулярных половых незащищенных актов (или в течение 6 месяцев в том случае, если женщина моложе 35 лет) (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013). По всему миру с данной проблемой сталкивается около 15% пар репродуктивного возраста; мужской фактор является наиболее значимым примерно в половине случаев (Sun, 2019). Бесплодие, как и сам процесс его лечения, неизбежно оказывают влияние на качество жизни пациентки, вызывая финансовые трудности, депрессию, социальный дискомфорт (Massarotti, 2019).

В настоящее время для борьбы с бесплодием доступны вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ). Ежегодно совершается около 2 миллионов циклов ВРТ по всему миру, из которых лишь ~25% приводят к успешному исходу беременности (de Mouzon, 2020). Учитывая высокую стоимость процедур, относящихся к ВРТ, а также возможные нежелательные явления, связанные с высокой экзогенной гормональной нагрузкой, разработка подходов к предсказанию исходов ВРТ-циклов представляется крайне актуальной.

Известно, что низкое качество эмбриона ответственно за ~30% неудачных имплантаций (Oron, 2014; Zhu, 2014). Введение в клиническую практику морфологического и преимплантационного генетического тестирования эмбрионов позволило в некоторой степени повысить шансы на успешную имплантацию при ЭКО и ИКСИ, однако частота успешных исходов данных процедур все равно остается субоптимальной, именно поэтому необходимо было обратить внимание на вторую, более значимую, причину нарушения имплантации – пониженную рецептивность эндометрия (РЭ) (Baltaci, 2006).

РЭ – это способность эндометрия принять эмбрион и обеспечить для него оптимальные трофический статус и микроокружение (Lessey & Young, 2019). Другими словами, РЭ является величиной эмбрионально-эндометриального взаимодействия. Появляется все больше доказательств того, что РЭ может быть подвержена как влиянию различных иммунных медиаторов (Jain, 2022), так и эндометриальной микробиоты (Diaz-Martínez, 2021; Moreno, 2022; Vitagliano, 2022). Однако в настоящее время не существует общепризнанного подхода к оценке РЭ вне констатации факта наступления/ненаступления беременности. Был проведен ряд исследований, посвященных оценке РЭ посредством анализа биоптата эндометрия, гистероскопии и ультразвукового исследования (Jin, 2017; Jinno, 2001; Maia-Filho, 2015). К сожалению, в недавнем мета-анализе было заключено, что данные подходы к оценке РЭ не способны эффективно прогнозировать клиническую беременность в ВРТ-цикле (Craciunas, 2019).

Более того, биопсия является крайне инвазивной процедурой, которая не допускается в цикле переносе эмбриона (ПЭ), тогда как воспроизводимость результатов анализа, полученных в предшествующих циклах, в целевом цикле не гарантирована. А ее изучение не представляется возможным по этическим соображениям, так как потребовало бы проведения многократных биопсий эндометрия у пациенток с бесплодием, при отсутствии на то медицинских показаний.

Общеизвестным трендом в современной персонализированной медицине является неинвазивность. Некоторые авторы предлагают подходы к сбору эндометриального материала без каких-либо травмирующих вмешательств, например, забор эндометриальных смывов, прямую аспирацию эндометриального секрета и даже сбор остаточных клеток и слизи с катетера для ПЭ (Boomsma, 2009; Camargo-Díaz, 2017). Однако эти процедуры возможны лишь непосредственно до или после ПЭ. Таким образом, хоть они и позволяют изучить биоматериал из эндометрия в ключевой момент цикла – в момент имплантации, они не имеют какой-либо прогностической ценности, так как после ПЭ принятие каких-либо клинических решений уже невозможно.

В то же время менструальная кровь лишена вышеперечисленных недостатков, однако попыток анализировать данный биоматериал для оценки РЭ до сих не предпринималось. Во-первых, менструальная кровь находится в продолжительном контакте со стенками матки и может содержать любые релевантные молекулярные/микробиологические компоненты слизистой оболочки ткани. Во-вторых, данный биоматериал попадает в полость матки из спиральных артерий и может отражать состояние локальной системы микроциркуляции. В-третьих, менструальная кровь может быть просто и безболезненно собрана непосредственно из устья матки, так как шейка матки во время менструации размягчается, цервикальный канал становится проходимым. Подобный подход позволяет минимизировать контаминацию биоматериала компонентами шейки матки, влагалища и менструальной чаши. В-четвертых, менструальная кровь может быть собрана в самом начале цикла ПЭ. Таким образом, результаты оценки РЭ по данному биоматериалу могут быть использованы для принятия клинических решений, в частности отсрочки ПЭ до наступления цикла с оптимальной РЭ.

Цель исследования

Установить связь результатов цитокинового и микробиологического профилирования менструальной крови с рецептивностью эндометрия у пациенток с бесплодием.

Задачи исследования

1. Сравнить микробиологические профили биоматериала из полости матки, цервикального канала и влагалища у пациенток с бесплодием.
2. Установить различия в цитокиновых и микробиологических профилях менструальной крови у пациенток с успешным и неуспешным исходом криопереноса эмбриона.
3. Определить степень влияния гемолиза менструальной крови на результаты анализа уровней цитокинов при мультиплексном

иммунофлуоресцентном анализе с использованием магнитных носителей.

4. Установить связь результатов микробиологического профилирования биоматериала из эндометрия с клиническими данными пациенток и результатами гистологического исследования.
5. Определить связь цитокиновых профилей менструальной крови с эндометриозом и снижением овариального резерва.
6. Установить взаимосвязь результатов цитокинового и микробиологического профилирования менструальной крови.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный микробиологический анализ биоматериала на разных участках женского полового тракта у пациенток с бесплодием, включающий выявление не только ключевых представителей бактериальной микробиоты, но и грибов, а также вирусов семейства *Herpesviridae*. Подробно описаны различия в микробиологических профилях эндометрия, шейки матки и влагалища. Показана возможность присутствия в эндометрии микроорганизмов *Candida* spp. и *Atopobium vaginae*, а также *Cytomegalovirus* при их отсутствии в нижележащих частях женского полового тракта при ХЭ.

Впервые менструальная кровь была предложена для оценки РЭ. Проведено наиболее широкое цитокиновое и первое микробиологическое профилирование данного биоматериала, подразумевавшее анализ уровней 48 сигнальных молекул и 22 клинически значимых групп микроорганизмов и вирусов. Определены иммунные медиаторы, уровни которых могут быть использованы для оценки РЭ, а также отражают наличие эндометриоза и сниженного овариального резерва (СОР). Впервые показано, что преобладание *Lactobacillus* spp. связано с повышением уровней двух колониестимулирующих факторов, в свою очередь связанных с высокой РЭ.

Практическая значимость работы

Результаты сравнительного микробиологического профилирования биоматериала, собранного на разных участках женского полового тракта, у пациенток с бесплодием могут стать основанием для возможного внедрения микробиологического анализа эндометрия в клиническую практику. Ведь известно, что в настоящее время микробиологическое исследование биоматериала из матки не проводится ни в какой форме при планировании беременности, ведь многие годы данный орган считался стерильным и лишь в последнее время начали появляться доказательства обратного.

Продемонстрированный прогностический потенциал анализа ряда сигнальных молекул в менструальной крови в отношении успешного исхода ЭКО может способствовать разработке технологий анализа данного биоматериала с целью раннего определения циклов ПЭ с пониженной РЭ, а значит, с заведомо низкой вероятностью успешной имплантации. Это позволит снизить финансовые затраты частных лиц и системы здравоохранения на осуществление заведомо неудачных циклов ВРТ, сохранить эмбрионы высокого качества, число которых зачастую бывает ограничено, уберечь пациенток от нежелательных явлений, связанных с многократной гормональной стимуляцией при подготовке к имплантации.

Положения, выносимые на защиту

1. Эндометрий обладает микробиологическим профилем, значительно отличающимся от такового в шейке матки и влагалище.
2. У пациенток с рецептивным эндометрием повышены уровни ряда сигнальных молекул в менструальной крови, таких как G-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, MCP-1, M-CSF, SDF-1 α , TNF- β , TRAIL, SCF, IP-10 и MIG, что можно использовать для прогнозирования исхода криопереноса эмбриона, тогда как микробиологический профиль данного биоматериала в исследуемой когорте оказался не связан с рецептивностью эндометрия.

3. Гемолиз менструальной крови, происходящий в полости матки перед забором биоматериала, не оказывает значительного влияния на результаты измерения уровней широкого спектра сигнальных молекул при мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе с использованием магнитных носителей.
4. Микробиологический профиль эндометриального биоматериала не связан с наличием основных факторов бесплодия, инфекций, передающихся половым путем, в анамнезе и эндометриальных полипов. Однако у пациенток с хроническим эндометритом чаще встречаются микроорганизмы группы *Megasphaera* spp. + *Veillonella* spp. + *Dialister* spp.
5. При эндометриозе наблюдаются пониженные уровни IP-10 и SCGF- β в менструальной крови, тогда как при снижении овариального резерва – пониженные уровни IL-10 и MIG.
6. Преобладание *Lactobacillus* spp. в менструальной крови значимо связано с повышением уровней G-CSF и M-CSF, в свою очередь повышенных у пациенток с рецептивным эндометрием.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность при преподавании курса «Микробиология, вирусология и иммунология» кафедры Многопрофильной клинической подготовки Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Диссертационная работа апробирована 05 мая 2023 года на объединенной конференции Кафедры многопрофильной клинической подготовки и Кафедры терапии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; Отдела лабораторной

диагностики, Отдела гинекологии и репродуктивной медицины, Отдела возраст-ассоциированных заболеваний и Института регенеративной медицины обособленного подразделения Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

По теме диссертации опубликованы три научные статьи в изданиях, индексируемых в Web of Science (Clarivate, Лондон, Великобритания) и входящих в Q1 и Q2 по рейтингу SJR Scopus (Elsevier, Амстердам, Нидерланды), приравненных к публикациям в изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Результаты доложены на международной медицинской конференции, а также включены в отчет о научно-исследовательской работе Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» в рамках исполнения государственного задания.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.3.8 – клиническая лабораторная диагностика. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2, 3, 4, 7, 9 и 11 паспорта специальности.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка иллюстративного материала, списка литературы, который включает в себя 189 источников (16 русскоязычных и 173 англоязычных), 4 приложений. Работа включает 8 таблиц (из них 4 в приложениях) и иллюстрирована 28 рисунками (из них 12 в приложениях).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология исследования

Общая информация

Исследование было разделено на два этапа. В рамках этапа 1 проводилось сравнительное микробиологическое профилирование биоматериала из эндометрия, шейки матки и влагалища у пациенток с бесплодием, которым выполняется гистероскопия в соответствии с назначением лечащего врача. Этап 2 подразумевал цитокиновое и микробиологическое профилирование менструальной крови у пациенток с бесплодием в цикле, в котором им проводился перенос замороженного эмбриона в рамках прохождения программы ЭКО или ЭКО/ИКСИ. Участники исследования в двух этапах не совпадали.

В этап 1 исследования было включено 100 пациенток, которые должны были пройти гистероскопию с биопсией эндометрия как составную часть своего лечения на 5-12-й дни менструального цикла. Были проведены гистологический (выявление эндометриальных полипов) и иммуногистохимический (окраска по CD138) исследования препаратов эндометрия. В качестве порогового значения для установления ХЭ было принято количество CD138-позитивных клеток равно или более 5 как минимум в 1 из 30 полей высокого увеличения (Li, 2021).

Критериями исключения пациенток из исследования был прием антибиотиков или перенесение инфекций, передающиеся половым путем (ИППП), за 3 месяца до включения в исследование, а также наличие онкологических заболеваний.

В этап 2 исследования было включено 42 пациентки, которым был запланирован крио-ПЭ (как часть программы ЭКО или ЭКО/ИКСИ). Критерии исключения были идентичны таковым в этапе 1. Пациентки были разделены на две группы в зависимости от исхода ПЭ. Таким образом, 19 пациенток составили группу «беременность наступила» (беременность наступила), тогда как 23 – группу «беременность не наступила» (беременность не наступила).

Сбор образцов биоматериала

В этапе 1 исследования получение образцов производилось восходящим путем для снижения вероятности контаминации верхних отделов женского полового тракта. Соскобы из влагалища и шейки матки выполнялись с помощью цитощеток. Эндометриальные образцы были получены с использованием Пайпель катетера, который был введен в полость матки через наружный катетер для инсеминации 3,5 мм для снижения вероятности контакта со слизью шейки матки.

В рамках этапа 2 исследования менструальная кровь собиралась на 2-3-й дни цикла крио-ПЭ непосредственно из полости матки с использованием катетера для ПЭ Guardia Access Transfer Catheter K-JETS-7019 (Cook Medical Inc., Блумингтон, Индиана, США), соединенного со шприцем. Данная процедура была полностью безболезненна.

Микробиологический анализ

Из образцов биоматериала для этапа 1 исследования ДНК выделялась с использованием набора реагентов «ПРОБА-НК-ПЛЮС» (ДНК-Технология, Москва, Россия). В то же время из менструального осадка (этап 2 исследования) ДНК выделялась при помощи набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Хильден, Германия) колоночным методом. Для контроля системной контаминации на этом и последующих этапах работы с биоматериалом аналогичные процедуры проводились с отрицательными контрольными образцами.

Микробиологические профили были проанализированы с использованием следующих коммерческих наборов на приборе для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) DT-Prime (ДНК-Технологии, Москва, Россия), согласно протоколам разработчика: «Фемофлор 16», «TNC Complex», «ГерпесКомплекс» (ДНК-Технология, Москва, Россия). Вышеуказанные реагенты позволили осуществить количественный анализ общей бактериальной массы (по детектированию консервативных прокариотических

последовательностей ДНК), *Lactobacillus spp.*, Enterobacteriaceae, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *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*, *Candida spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum u parvum)*, *Mycoplasma genitalium*, а также качественный анализ *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, Herpes Simplex 1 и 2, Cytomegalovirus. Помимо этого, были измерены уровни человеческой ДНК для контроля качества сбора биоматериала ($>10^3$ копий на реакцию смесь).

Результаты ПЦР-РВ анализировались в программном обеспечении RealTime_PCR (ДНК-Технология, Москва, Россия), разработанном непосредственно для используемых наборов реагентов. Установленный разработчиком пороговый цикл ПЦР-РВ для качественного анализа был равен 24, тогда как пороговый уровень для количественного анализа составил $>10^3$ копий на реакцию смесь. Результаты количественного анализа нормализовались по уровню общей бактериальной массы и представлялись в виде параметра «обсемененность», выраженного в процентах.

Анализ иммунных медиаторов

Анализ цитокинов, хемокинов и факторов роста в супернатанте менструальной крови проводился с использованием набора реактивов для мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа с магнитными частицами Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening 48-Plex на приборе Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories Inc., Геркулес, Калифорния, США). Данная панель включала следующие аналиты: FGF; Eotaxin; G-CSF; GM-CSF; M-CSF; IFN- γ ; IFN- $\alpha 2$; IL-1 β ; IL-1ra; IL-1 α ; IL-2R α ; IL-3; IL-12 (p40); IL-16; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-12 (p70); IL-13; IL-15; IL-17A; IL-18; GRO- α ; HGF; LIF; MCP-1; MCP-3; IP-10; MIG; NGF- β ; SCF; SCGF- β ; SDF-1 α ; MIP-1 α ; MIP-1 β ; PDGF-BB; RANTES; TNF- α ; TNF- β ; VEGF; STACK; TRAIL.

Из-за высокой вариабельности исхода забора менструальной крови (в первую очередь, неизвестное соотношение крови к эндометриальному секрету) уровни всех анализируемых иммунных факторов нормализовались по общему белку и представлялись как пг анализата на мг общего белка. Уровень общего белка анализировался на автоматизированном биохимическом анализаторе AU480 (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). В части образцов менструального супернатанта были видимые признаки гемолиза разной степени, уровни гемоглобина в каждом образце определялись спектрофотометрически на приборе Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США), чтобы оценить его влияние на результаты анализа цитокинов.

Статистический анализ

Статистический анализ был осуществлен в программном обеспечении IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США). Нормальность распределения была оценена с использованием критерия Шапиро-Уилка. После установления отсутствия нормального распределения во всех выборках сравнение переменных было осуществлено с помощью непараметрических критериев. Количественные данные представлены как медиана и интерквартильный размах, если не указано иное. Сравнение групп производилось при помощи критериев Кохрена, Фридмана, Вилкоксона, Манна-Уитни и Фишера в зависимости от характера данных и количества введенных в анализ выборок. Корреляционный анализ проводился с использованием рангового коэффициента Спирмена (r_s), который интерпретировался по шкале Чеддока. Поиск ассоциаций между переменными был проведен с помощью бинарной логистической регрессии. Подсчет индекса α -разнообразия Шэннона был произведен для характеристики разнообразия популяций микроорганизмов. Нулевая гипотеза отвергалась при значении $p < 0,05$. Поправка на множественные сравнения проводилась по методу Бенджамини-Хохберга. p -значения, значимые после применения поправки, помечались символом «*».

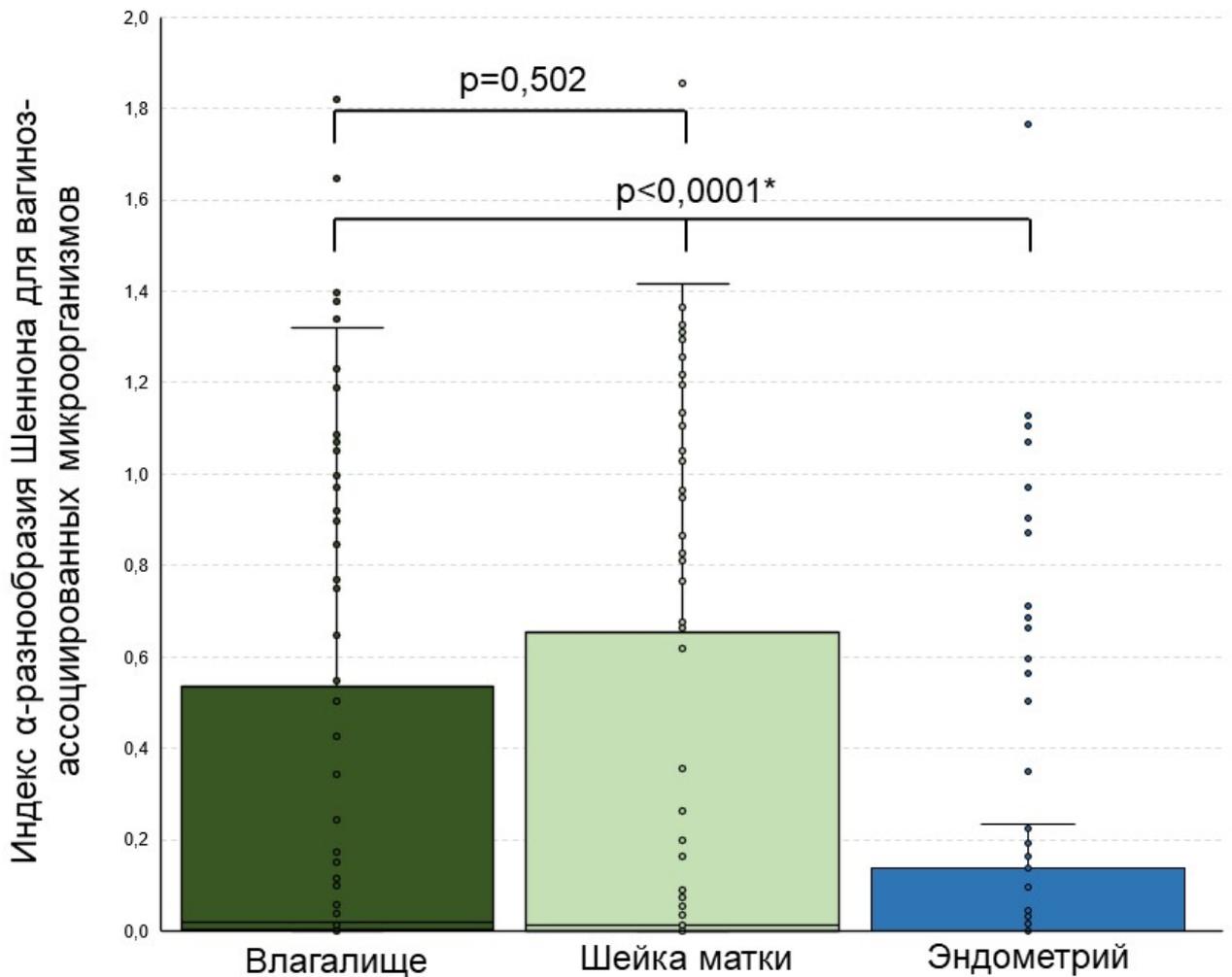
Результаты первого этапа исследования

Все проанализированные образцы прошли контроль качества взятия биоматериала и содержали человеческую ДНК. В образцах отрицательного контроля не было обнаружено контаминации человеческой, бактериальной, грибковой или вирусной ДНК. Общая бактериальная нагрузка, выраженная в копиях бактериальных геномов на реакционную смесь, статистически значимо различалась в образцах влагалища, шейки матки и эндометрия ($7,9 \times 10^7$ ($2,5 \times 10^7$; $2,5 \times 10^8$) против $1,3 \times 10^7$ ($2,7 \times 10^6$; $4,0 \times 10^7$) против $6,3 \times 10^3$ ($1,6 \times 10^3$; $4,0 \times 10^4$) копий в реакционной смеси, соответственно, $p < 0,0001^*$ для всех групп сравнения).

Анализ разнообразия микробиоты установил, что индексы Шэннона были сопоставимы в шейке матки и влагалище ($1,4 \times 10^{-2}$ ($1,6 \times 10^{-3}$; $6,5 \times 10^{-1}$) против $1,9 \times 10^{-2}$ ($2,3 \times 10^{-3}$; $5,3 \times 10^{-1}$), соответственно, $p = 0,502$), в то время как индекс Шэннона для эндометрия значительно отличался от двух вышеприведенных величин (0 (0 ; $1,4 \times 10^{-1}$), $p < 0,0001^*$) (Рисунок 1).

Сравнение выявляемости каждого анализируемого таксона представлено на Рисунке 2. Такие патогенные агенты, как *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и Herpes Simplex Virus 2, отсутствовали во всех исследуемых образцах. Микробиологический профиль эндометрия отличался от такового в нижележащих отделах женского полового тракта по частоте выявления 14 из 17 обнаруженных хотя бы единожды таксонов ($p < 0,05^*$), за исключением *Candida spp.*, в случае которого значимые отличия наблюдались только при сравнении с влагалищными образцами.

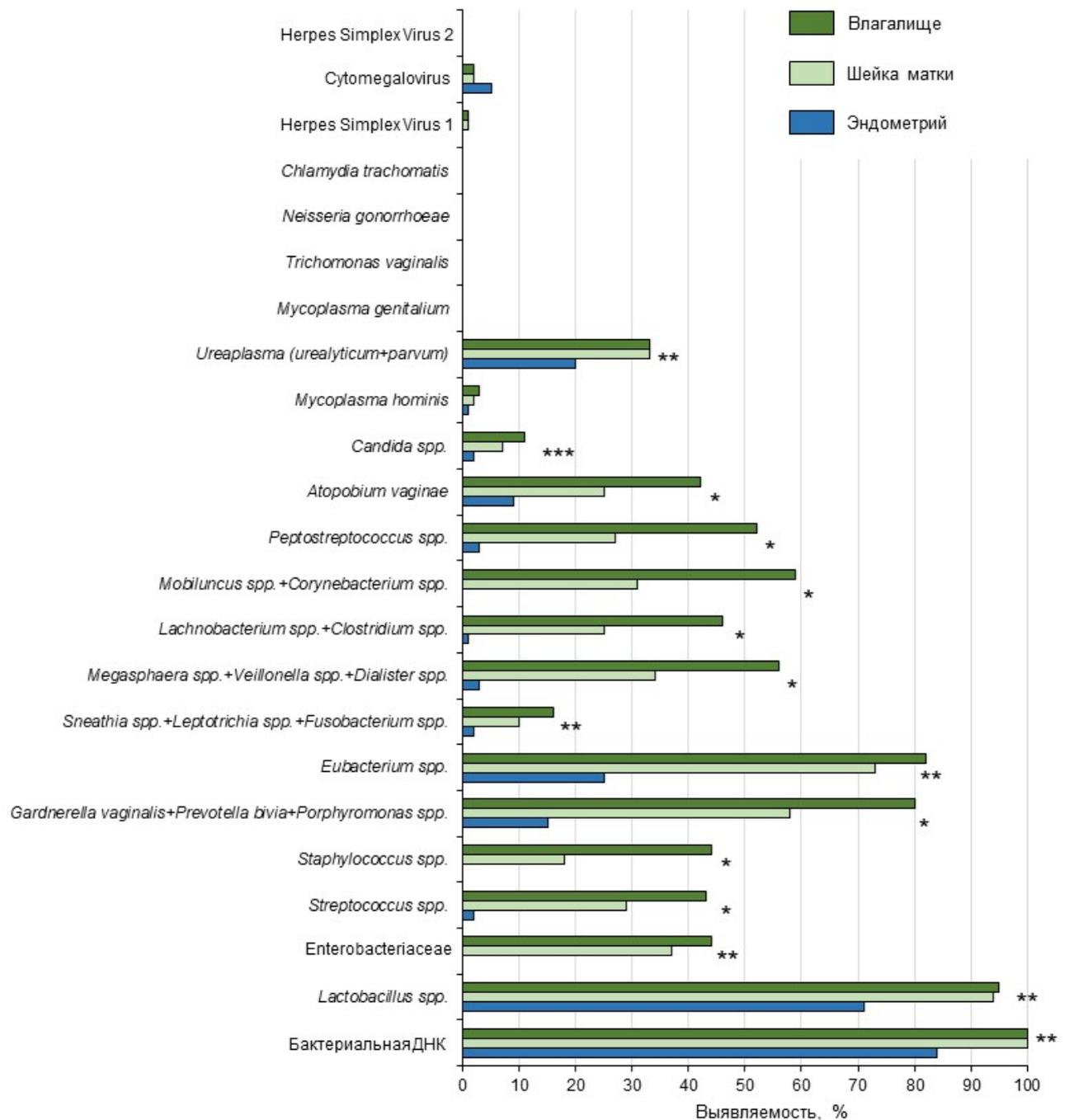
В связи с тем, что в эндометрии в среднем менее выражено микробиологическое разнообразие, выявление определенного таксона исключительно в эндометрии при его отсутствии в нижележащих отделах женского полового тракта у одной и той же пациентки, представляется особенно интересным. Всего было 6 случаев, подходящих под данное описание: Cytomegalovirus – 3 пациентки; *Candida spp.* – 1 пациентка; Cytomegalovirus + *Candida spp.* – 1 пациентка, *Atopobium vaginae* – 1 пациентка.



Символом «*» обозначены р-значения, значимые после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок 1 – Сравнение α-разнообразия микробиоты влагалища, шейки матки и эндометрия

Для выявления взаимосвязей между результатами качественного и количественного анализа эндометриальной микробиоты и клиническими параметрами, такими как ХЭ, полипы матки, снижение овариального резерва, эндометриоз, ИППП в анамнезе была использована бинарная логистическая регрессия. Единственная значимая взаимосвязь была обнаружена для группы *Megasphaera* spp. + *Veillonella* spp. + *Dialister* spp. и ХЭ (отношение шансов 19,3; доверительный интервал: 1,6–243,7; $p=0,02^*$). Учет результатов этапа 2 не влиял на значимость ассоциативных связей.



* – значимые различия для трех отделов женского полового тракта ($p < 0,05$);
 ** – значимые различия только при сравнении эндометрия с влагалищем / шейкой матки; *** – значимые различия только при сравнении эндометрия с влагалищем. Все различия значимы после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок 2 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов на этапе 1 исследования

Результаты второго этапа исследования

Цитокиновое профилирование менструальной крови

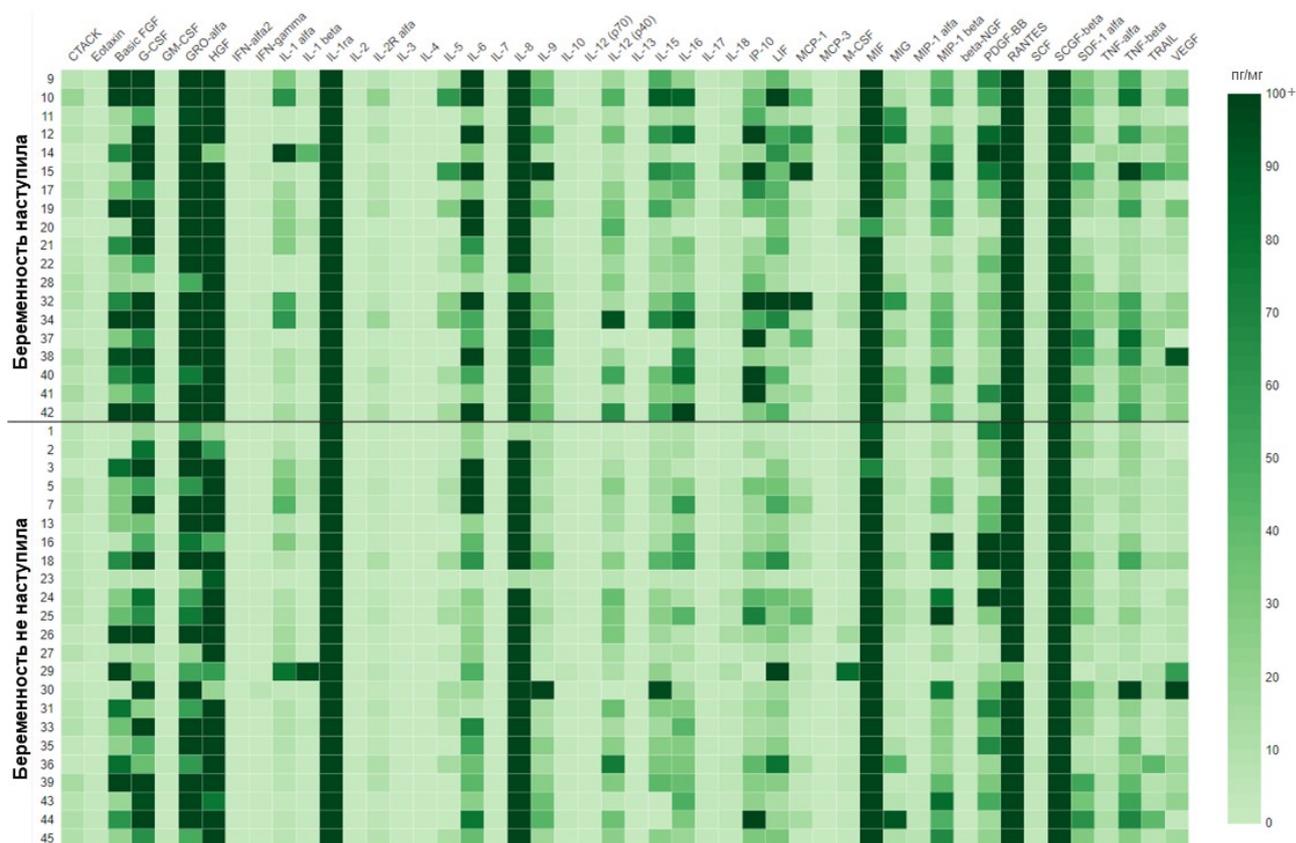
Все 48 иммунных медиаторов, входящих в заявленную аналитическую панель, оказались детектируемы в менструальном супернатанте (Рисунок 3). Среди проанализированных сигнальных молекул статистически значимая разница между группами «беременность наступила» и «беременность не наступила» была обнаружена для G-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, MCP-1, SDF-1 α , TNF- β , M-CSF*, TRAIL*, SCF*, IP-10* и MIG* ($p < 0,05$).

Стоит отметить, что аналиты IP-10 и MIG продемонстрировали значимый прогностический потенциал в отношении наступления беременности (площади под ROC-кривой 0,762 и 0,773 соответственно). При пороговом значении 17,99 пг/мг IP-10 позволял предсказывать успешный исход крио-ПЭ с чувствительностью 95% и специфичностью 57%.

В ходе анализа было установлено, что у пациенток с эндометриозом, по сравнению с таковыми без данного диагноза, в менструальном супернатанте наблюдались статистически значимо более низкие уровни IP-10 и SCGF- β (16,03 (7,12; 33,57) против 29,23 (17,91; 65,38) пг/мг, $p = 0,044$ и 3937 (2499; 5989) против 7206 (3379; 12073) пг/мг, $p = 0,015^*$, соответственно). В то время как у пациенток с СОР были понижены уровни IL-10 и MIG (0,66 (0,35; 1,20) против 1,46 (1,03; 2,49) пг/мг, $p = 0,006^*$ и 6,88 (4,04; 10,79) против 14,30 (6,77; 29,70) пг/мг, $p = 0,008^*$, соответственно).

Присутствие гемолиза в образцах менструальной крови оказало довольно малое влияние на измерения уровней цитокинов. Статистически значимая корреляция ($p < 0,05$) с уровнем гемоглобина была обнаружена только для Eotaxin, GM-CSF, IL-4, IL-9, IL-10, IL-18, MIP-1 β , β -NGF, SCF, SDF-1 α , TNF- β (положительная, слабый эффект: r_s варьировал от 0,31 до 0,45) и для СТАСК, PDGF-BB, RANTES (положительная, умеренный эффект: r_s варьировал от 0,53 до 0,65). Дополнительная нормализация результатов измерения перечисленных

выше цитокинов по уровню гемоглобина не приводила к изменению значимости соответствующих исходов сравнения групп или анализа корреляции.



Для шкалы тепловой карты была установлена верхняя граница в 100 пг/мг анализа, чтобы обеспечить цветовое разделение в области низких концентраций.

Рисунок 3 – Тепловая карта для цитокинового профилирования менструальной крови

Микробиологическое профилирование менструальной крови

Результаты микробиологического профилирования менструальной крови в группах «беременность наступила» и «беременность не наступила» суммированы на тепловой карте (Рисунок 4). Во всех образцах отрицательного контроля было подтверждено отсутствие контаминации. Частота выявления и обсемененность, выраженная в процентах, ни для одного из анализируемых таксонов микроорганизмов и вирусов не оказались значимо различающимися при сравнении групп «беременность наступила» и «беременность не наступила», также не было различий у пациенток, разделенных на подгруппы на основании

наличия эндометриоза и СОР. Индексы α -разнообразия Шеннона не различались в группах «беременность наступила» и «беременность не наступила» (0 [0; 0,45] против 0 [0; 0,30], $p=0,401$, соответственно).

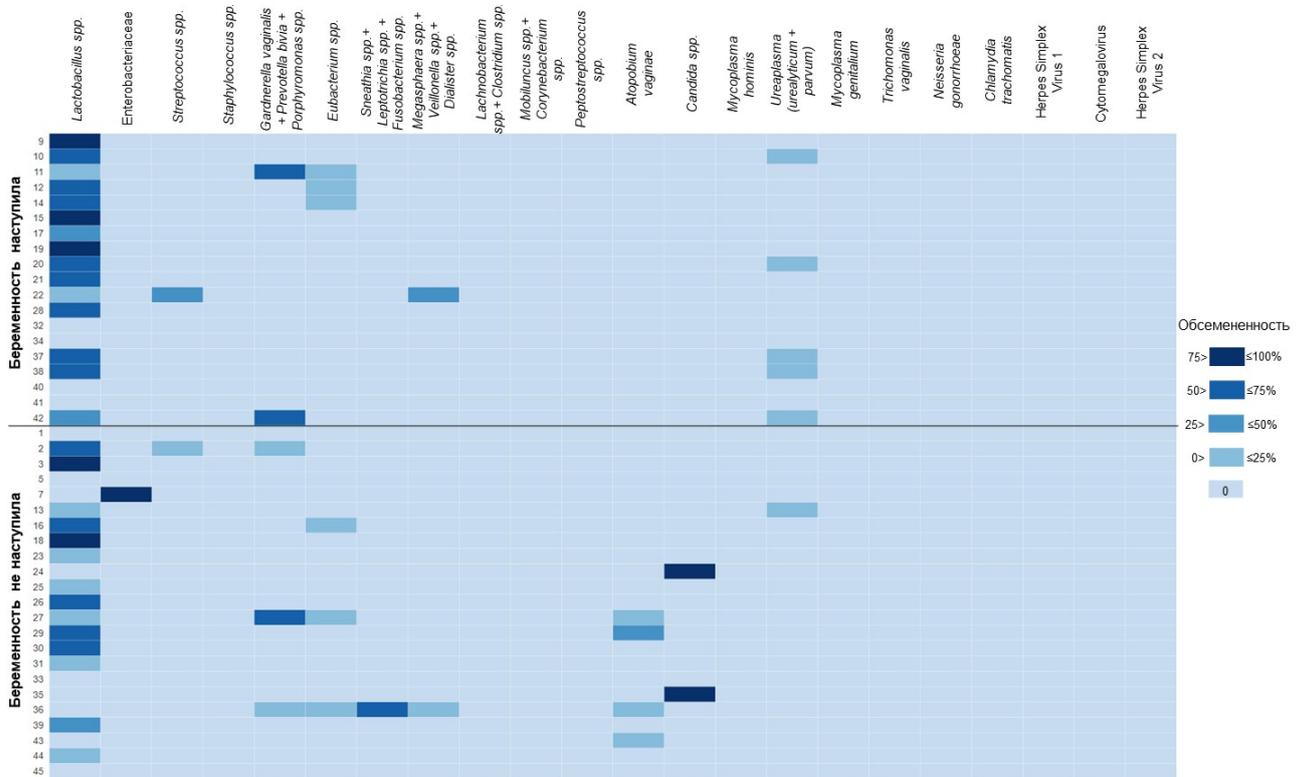


Рисунок 4 – Тепловая карта анализа микробиоты и вирусов в менструальной крови

Стоит отметить, что у трех пациенток из группы «беременность не наступила» вся микробиота менструальной крови была представлена либо микроорганизмами семейства Enterobacteriaceae, либо *Candida* spp. Несмотря на то, что данные случаи из-за низкой встречаемости не достигли значимости, подобное наблюдение может подчеркивать необходимость индивидуального подхода к анализу эндометриальной микробиоты при оценке РЭ.

Наконец, была изучена взаимосвязь между различными параметрами цитокинового и микробиологического профилирования. Было установлено, что обсемененность *Lactobacillus* spp. коррелирует с уровнями G-CSF ($r_s=0,36$, $p=0,019$) и M-CSF ($r_s=0,35$, $p=0,022$). Во обоих случаях корреляция была положительной со слабым эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндометрий пациенток с бесплодием обладает уникальным микробиологическим профилем, который не может быть отражен таковым в нижележащих отделах женского полового тракта. Обнаружение *Cytomegalovirus*, *Candida spp.* и *Atopobium vaginae* в аспирате эндометриального секрета при их отсутствии в соскобах из шейки матки и влагалища у одних и тех же пациенток подчеркивает, что, возможно, рутинного микробиологического изучения биоматериала из нижних отделов женского полового тракта может быть недостаточно для обследования перед прохождением тех или иных процедур ВРТ.

Менструальная кровь предоставляет уникальную возможность изучения различных параметров (как молекулярных, так и микробиологических) эндометрия в начале цикла ПЭ. С клинической точки зрения, данный момент оптимален для оценки РЭ и принятия возможного решения о переносе процедуры имплантации до наступления цикла с оптимальной РЭ. В настоящем исследовании было проведено первое подробное молекулярное и микробиологическое изучение менструальной крови у пациенток с бесплодием в цикле ВРТ. Предложенный подход к сбору биоматериала, подразумевающий взятие менструальной крови непосредственно из полости матки, позволял избежать контаминации биоматериала компонентами слизи из нижележащих отделов женского полового тракта, что повышало репрезентативность менструальной крови в отношении молекулярного и микробиологического состава эндометрия.

Выявленные статистически значимые различия в уровнях ряда цитокинов, хемокинов и ростовых факторов между группами «беременность наступила» и «беременность не наступила» подчеркивают потенциал менструальной крови как субстрата для изучения РЭ. Расширение выборки пациенток с установлением ключевых биомаркеров и последующей разработкой многофакторной модели

для оценки столь комплексной характеристики эндометрия, как его рецептивность, важны не только для предсказания исходов ВРТ-лечения, но и для установления потенциальных терапевтических мишеней для ее повышения.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Расширение выборки пациенток, проходящих лечение бесплодия с использованием ВРТ, включая ЭКО, ИКСИ и ВМИ, с ее разделением на обучающую и контрольную когорты.
2. Построение многофакторной модели для оценки РЭ по данным цитокинового и микробиологического профилирования менструальной крови в обучающей когорте с ее последующей валидацией в контрольной когорте.
3. Проведение интервенционного исследования с применением антибиотической или противовирусной терапии у пациенток с пониженной РЭ и данными микробиологического профилирования, соответствующими выраженному дисбалансу микробиоты или неблагоприятному вирусному статусу.
4. Изучение влияния различных клинических, социальных, демографических и психологических факторов на результаты оценки РЭ по данным цитокинового и микробиологического профилирования менструальной крови.

Выводы

1. Частота выявления 14 из 22 изученных групп микроорганизмов и вирусов значимо ($p < 0,05$) отличалась в аспирате эндометриального секрета при сравнении с биоматериалом из нижележащих отделов полового тракта. Индексы α -разнообразия микробиоты Шеннона в эндометрии были также значимо ниже, чем в шейке матки и влагалище ($0 (0; 1,4 \times 10^{-1})$ против $1,4 \times 10^{-2}$ ($1,6 \times 10^{-3}; 6,5 \times 10^{-1}$) и $1,9 \times 10^{-2}$ ($2,3 \times 10^{-3}; 5,3 \times 10^{-1}$), $p < 0,0001$, соответственно).

2. У пациенток с рецептивным эндометрием повышены уровни G-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, MCP-1, M-CSF, SDF-1 α , TNF- β , TRAIL и SCF ($p < 0,05$), а также IP-10 и MIG ($p < 0,01$) в менструальной крови. IP-10 и MIG продемонстрировали прогностический потенциал в отношении наступления клинической беременности в результате криопереноса эмбриона (площади под ROC-кривыми 0,762 и 0,773, соответственно). В то же время микробиологический профиль данного биоматериала оказался не связан с рецептивностью эндометрия ($p > 0,05$).
3. Гемолиз менструальной крови обладает незначительным влиянием на результаты измерения уровней цитокинов при мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе с использованием магнитных носителей. Уровень гемоглобина в супернатанте менструальной крови демонстрирует значимую положительную корреляцию с уровнями лишь 14 из 48 изученных цитокинов: Eotaxin, GM-CSF, IL-4, IL-9, IL-10, IL-18, MIP-1 β , β -NGF, SCF, SDF-1 α , TNF- β (слабый эффект, r_s от 0,31 до 0,45) и STACK, PDGF-BB, RANTES (умеренный эффект: r_s от 0,53 до 0,65).
4. Между результатами микробиологического профилирования эндометрия и наличием основных факторов бесплодия, эндометриальных полипов и анамнезом инфекций, передающихся половым путем, отсутствуют значимые ассоциации ($p > 0,05$). Тогда как при хроническом эндометрите значимо чаще встречаются микроорганизмы группы *Megasphaera* spp. + *Veillonella* spp. + *Dialister* spp. (отношение шансов 19,3, доверительный интервал: 1,6-243,7, $p = 0,02$).
5. У пациенток с эндометриозом, по сравнению с пациентками без данного состояния, были значимо ниже уровни IP-10 и SCGF- β (16,03 (7,12; 33,57) против 29,23 (17,91; 65,38) пг/мг, $p = 0,044$ и 3937 (2499; 5989) против 7206 (3379; 12073) пг/мг, $p = 0,015$, соответственно), тогда как у пациенток со снижением овариального резерва были понижены уровни

IL-10 и MIG (0,66 (0,35; 1,20) против 1,46 (1,03; 2,49) пг/мг, $p=0,006$ и 6,88 (4,04; 10,79) против 14,30 (6,77; 29,70) пг/мг, $p=0,008$, соответственно).

6. Обсемененность *Lactobacillus* spp. демонстрирует положительную корреляцию с уровнями G-CSF ($r_s=0,36$, $p=0,019$) и M-CSF ($r_s=0,35$, $p=0,022$), уровни которых, в свою очередь, значимо повышены у пациенток с рецептивным эндометрием ($p<0,05$).

Практические рекомендации

1. Для комплексной оценки микробиоты женского полового тракта в научных исследованиях целесообразно, в дополнение к рутинно анализируемым соскобам и мазкам с шейки матки и влагалища, проводить микробиологический анализ биоматериала из эндометрия.
2. Сбор менструальной крови из полости матки при помощи катетера для ПЭ может быть использован в качестве неинвазивной альтернативы аспирации эндометриального секрета для микробиологических исследований.
3. При количественном анализе биомаркеров белковой природы в супернатанте менструальной крови, собранной напрямую из полости матки, целесообразно нормализовать результаты измерений по уровню общего белка в том же образце ввиду неоднородности степени разведения биоматериала при его сборе.
4. При иммунофлуоресцентном анализе молекулярных биомаркеров в супернатанте менструальной крови целесообразно контролировать степень гемолиза в биоматериале путем измерения концентрации свободного гемоглобина, однако необходимость введения дополнительной нормализации по его уровню должна рассматриваться лишь в случаях с выраженной зависимостью между уровнями гемоглобина и анализируемого аналита.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. Jain, M. Mucosal biomarkers for endometrial receptivity: a promising yet underexplored aspect of reproductive medicine. / M. Jain, L. Samokhodskaya, E. Mladova [et al.] // **Systems Biology in Reproductive Medicine**. – 2021. – Vol. 68. – N. 1. – P. 13–24. – DOI 10.1080/19396368.2021.1985186.
2. Jain, M. Microbiological and cytokine profiling of menstrual blood for the assessment of endometrial receptivity: a pilot study. / M. Jain, E. Mladova, A. Shichanina [et al.] // **Biomedicines**. – 2023. – Vol. 11. – N. 5. – 1284. – DOI 10.3390/biomedicines11051284.
3. Jain, M. Comparison of microbial profiles and viral status along the vagina-cervix-endometrium continuum of infertile patients / M. Jain, E. Mladova, A. Dobychna [et al.] // **Systems Biology in Reproductive Medicine**. – 2023. – Vol. 69. – N. 4. – P. 310–319. DOI 10.1080/19396368.2023.2195040.