

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

Джайн Марк

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

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.м.н., доцент, Самоходская Л.М.

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Способы малоинвазивного взятия биоматериала из эндометрия.....	12
1.2 Безопасность сбора биоматериала из эндометрия	12
1.3 Молекулярные биомаркеры слизистой эндометрия	14
1.3.1 Исследования одиночных биомаркеров в эндометриальной жидкости	14
1.3.1.1 Человеческий децидуа-ассоциированный белок 200	15
1.3.1.2 Интерлейкин-18.....	15
1.3.1.3 Обогащенный лейцином $\alpha 2$ -гликопротеин	16
1.3.1.4 Урокортин.....	16
1.3.1.5 Активин А	17
1.3.1.6 Гликоделин	18
1.3.2 Исследования множественных биомаркеров в эндометриальной жидкости	18
1.3.2.1 Цитокины	21
1.3.2.2 Биомаркеры оксидативного стресса	21
1.4 Время и способ сбора эндометриальной жидкости	22
1.5 Цервикагинальные смывы	24
1.6 Остаточные клетки на катетере для переноса эмбрионов.....	24
1.7 Менструальная кровь	25
1.8 Ультразвуковые биомаркеры рецептивности эндометрия.....	26
1.8.1 Толщина эндометрия.....	27
1.8.2 Объем эндометрия	28

1.8.3 Паттерн эндометрия	29
1.8.4 Значимость средних значений ультразвуковых биомаркеров	29
1.9 Микробиота эндометрия	300
1.9.1 Представители эндометриальной микробиоты	312
1.9.2 Препятствия на пути изучения микробиоты эндометрия	333
Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	377
2.1 Общая информация	377
2.2 Сбор образцов биоматериала	411
2.3 Микробиологический анализ	422
2.4 Анализ иммунных медиаторов.....	433
2.5 Статистический анализ	477
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
3.1 Этап 1 исследования.....	49
3.2 Этап 2 исследования.....	544
3.2.1 Цитокиновое профилирование менструальной крови.....	544
3.2.2 Микробиологическое профилирование менструальной крови.....	611
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	688
4.1 Возможность контаминации биоматериала из эндометрия	688
4.2 Микробиологический континуум женского полового тракта	700
4.3 Связь микробиоты эндометрия с клиническими данными	711
4.4 Иммунные медиаторы в эндометриальном материале.....	722
4.5 Микробиота менструальной крови	744
4.6 Ограничения исследования	755
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	777
Перечень сокращений и условных обозначений	822
Список литературы	85

Список иллюстративного материала	1055
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Биомаркеры рецептивности в эндометриальной жидкости	1077
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (обязательное) Обсемененность репродуктивного тракта микроорганизмами	1111
ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное) Результаты цитокинового профилирования менструальной крови	1144
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (обязательное) Сравнение уровней цитокинов.....	1188

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы 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) [135]. По всему миру с данной проблемой сталкивается около 15% пар репродуктивного возраста; мужской фактор является наиболее значимым примерно в половине случаев [164]. Во многих странах борьба с бесплодием признана ключевой задачей здравоохранения [54]. Бесплодие, как и сам процесс его лечения, неизбежно оказывают влияние на качество жизни пациентки, вызывая финансовые трудности, депрессию, социальный дискомфорт [65, 115].

В настоящее время для борьбы с бесплодием доступны вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) и внутриматочная инсеминация (ВМИ). Ежегодно совершается около 2 миллионов циклов ВРТ по всему миру, из которых лишь ~25% приводят к успешному исходу беременности [123]. 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 [129, 189]. 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 обратить внимание на вторую, более значимую, причину нарушения имплантации – пониженную рецептивность эндометрия (РЭ) [23].

РЭ – это способность эндометрия принять эмбрион и обеспечить для него оптимальные трофический статус и микроокружение [106]. Другими словами, РЭ это величина эмбрионально-эндометриального взаимодействия. Появляется все больше доказательств того, что РЭ может быть подвержена как влиянию различных иммунных медиаторов [78], так и эндометриальной микробиоты (и потенциально связанного с ней хронического эндометрита (ХЭ)) [52, 122, 173]. Однако в настоящее время не существует общепризнанного подхода к оценке РЭ вне констатации факта наступления/ненаступления беременности. Для более удобного повседневного профессионального использования был введен другой термин – окно имплантации, которое фактически является отрезком времени, когда РЭ находится на своем пике и шансы на успешную имплантацию наиболее высоки [39]. Был проведен ряд исследований, посвященных оценке РЭ посредством анализа биоптата эндометрия, гистероскопии и ультразвукового исследования [82, 84, 114, 148, 151]. К сожалению, в недавнем мета-анализе было заключено, что данные подходы к оценке РЭ не способны эффективно прогнозировать клиническую беременность в ВРТ-цикле [49].

Прогресс в области геномных, эпигеномных и протеомных исследований позволил по-новому взглянуть на процесс имплантации [19]. Благодаря этому появились современные молекулярные диагностические тесты РЭ, такие как «ERA» и «Map/ER Grade», в рамках которых происходит оценка РЭ-статуса и предсказание окна имплантации на основании результатов высокопроизводительного анализа экспрессии генов, связанных с имплантацией в биопсийном материале эндометрия [51, 56]. В предварительных исследованиях с использованием теста «ERA» были получены многообещающие результаты, однако его реальный клинический потенциал неизвестен в связи с прекращением основного клинического исследования (NCT01954758) в 2019 г. [146, 166]. Так или иначе, биопсия является крайне инвазивной процедурой, которая не допускается в цикле переноса 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 [31, 37]. 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.

Впрочем, менструальная кровь лишена вышеперечисленных недостатков, но по какой-то причине данный биоматериал совершенно не используется для изучения РЭ. 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. Такой подход позволит 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 наличия 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 группы клинически значимых 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.

Внедрение результатов работы

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

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 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова в рамках исполнения государственного задания.

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.

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).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Способы малоинвазивного взятия биоматериала из эндометрия

Биологические субстраты доступные для малоинвазивного изучения РЭ схематически изображены на Рисунке 1. Эндометриальная жидкость является самым очевидным и наиболее изученным биологическим субстратом для анализа биомаркеров РЭ, однако она обладает рядом недостатков, таких как малый объем биоматериала и относительная инвазивность [78]. Сбор данного биоматериала может проводиться как в ходе прямой аспирации, так и в виде смывов, полученных при помощи орошения полости матки стерильным физиологическим раствором. Стоит упомянуть и нестандартный, но обладающий теми же недостатками, что и аспирация эндометриальной жидкости, подход к получению биоматериала из эндометрия – сбор остаточных клеток и слизи на катетере для ПЭ.

Секрет в других участках женского полового тракта также может отражать РЭ. Например, ниже будет обсужден потенциал анализа цервикагинальных смывов. Впрочем, фолликулярная жидкость, которая активно изучается в отношении поиска связи с исходами ВРТ, не будет рассматриваться в данном обзоре литературы. Причиной тому явилось то, что биомаркеры фолликулярной жидкости в первую очередь отражают характеристики ооцита, а не РЭ: качество и количество ооцитов, параметры оплодотворения и фрагментации эмбриона [46, 124, 183].

1.2 Безопасность сбора биоматериала из эндометрия

В клинической практике в основном принято считать, что эндометрий женщин, проходящих цикл ВРТ, является крайне хрупкой системой, поэтому какой-либо сбор биоматериала (особенно в момент близкий к имплантации) представляется нежелательным. Несмотря на то, что уже упомянутый забор эндометриальной жидкости не является столь же инвазивным, как, например, биопсия эндометрия, безопасность получения этого биоматериала все же

необходимо доказать. М. van der Gaast и соавт. в 2003 г. и С. Boomsma и соавт. в 2009 г. провели исследования с идентичной методологией, посвященные доказательству отсутствия негативных последствий для исхода ЭКО при прямой аспирации эндометриального секрета непосредственно перед ПЭ [32, 62]. Суммарно они сравнили 276 пациенток, подвергшихся прямой аспирации эндометриального секрета, с 276 контрольными пациентками, проходящими ЭКО. Статистически значимой разницы между исходами имплантации обнаружено не было. Таким образом, эндометриальная жидкость обладает рядом преимуществ перед биоптатом, ее сбор в день ПЭ менее инвазивен и вполне безопасен. Впрочем, ключевым ограничением такого подхода остается ранее упомянутое отсутствие прогностической ценности с точки зрения принятия клинических решений.



Рисунок 1 — Биологические субстраты доступные для малоинвазивного изучения РЭ

Разумеется, на данный момент не существует исследований, посвященных оценке риска биопсии эндометрия в день ПЭ, однако все же есть работы, в которых оценивалась безопасность биопсии в цикле, предшествующем имплантационному. Более того, оказалось, что подобная травматизация эндометрия может даже быть благоприятна для имплантации [24]. Последующие небольшие клинические исследования подтвердили, что травматизация эндометрия улучшает исход ВРТ, и некоторые специалисты тут же начали вводить это в практику, не обладая достаточной информацией о механизме и реальной клинической пользе, доказать наличие которой можно только в ходе крупных рандомизированных контролируемых исследований [103]. Выдвигались гипотезы о биологическом механизме, в основном предполагалось, что травматизация эндометрия запускает регенеративные процессы, которые ведут к позитивному сдвигу в цитокиновом балансе и изменениям в толщине эндометрия [108]. Лишь несколько лет спустя, когда завершились рандомизированные контролируемые исследования и были опубликованы соответствующие мета-анализы, эксперты пришли к выводу, что травматизация эндометрия либо вовсе не обладает позитивным эффектом для имплантации, либо обладает незначительным, проявляющимся лишь в некоторых подгруппах пациенток; таким образом, данная методика не должна применяться в клинической практике до появления новой информации [74, 152]. Для исследований, посвященных изучению биомаркеров РЭ, данное заключение означает, что проведение биопсии эндометрия в цикле, предшествующем имплантационному, является вполне безопасным вмешательством, однако все же тот факт, что момент сбора биоматериала довольно сильно удален от дня ПЭ, может оказаться значительным недостатком.

1.3 Молекулярные биомаркеры слизистой эндометрия

1.3.1 Исследования одиночных биомаркеров в эндометриальной жидкости

Результаты исследований, посвященных анализу одиночных биомаркеров РЭ в эндометриальной жидкости, суммированы в Приложении А Таблице 1. Во всех

случаях эндометриальная жидкость была получена при помощи орошения полости матки физиологическим раствором, однако день цикла, избранный для сбора биоматериала, существенно отличался от исследования к исследованию.

1.3.1.1 Человеческий децидуа-ассоциированный белок 200

Первой попыткой оценить прогностический потенциал данного биомаркера в отношении наступления беременности в эндометриальной жидкости было исследование, проведенное R. Halperin и соавт. в 1995 г. [71]. Человеческий децидуа-ассоциированный белок 200 (англ. – human decidua-associated protein 200, hDP 200) был обнаружен и описан той же группой ученых ранее в эндометриальном секрете, [67, 70]. Авторы предполагали, что hDP 200 вовлечен в процесс функционального развития ткани эндометрия. Данный биомаркер анализировался в эндометриальных смывах, полученных в день ПЭ. Была обнаружена статистически значимая ассоциация ($p < 0,05$) между повышенными уровнями hDP 200 и вероятностью наступления беременности. Тем не менее аналитические параметры этого биомаркера, такие как чувствительность и специфичность, оказались довольно низкими (57,15% и 69,47% соответственно). В дальнейшем попытки использовать данный биомаркер для оценки РЭ не проводились. Лишь 3 года спустя R. Halperin и соавт. изучали связь hDP 200 с эктопической беременностью, и статистически значимых результатов не было обнаружено [72].

1.3.1.2 Интерлейкин-18

Интерлейкин-18 (англ. – interleukin-18, IL-18) играет важную роль в регуляции цитокинового микроокружения матки [77, 184, 186]. IL-18 модулирует ответ как врожденного, так и приобретенного иммунитета, контролирует баланс Т-хелперов, регулирует пролиферацию и смену фенотипа натуральных киллеров [156, 161]. Ввиду его всеобъемлющей роли в иммунном балансе матки N. Lédée-Bataille и соавт. в 2004 году избрали IL-18 в качестве биомаркера РЭ [101]. В исследовании приняли участие 133 пациентки, уровни IL-18 были измерены в эндометриальных смывах, полученных непосредственно перед забором ооцитов в

цикле ЭКО. Авторы пришли к выводу, что у пациенток с недетектируемыми уровнями IL-18 вероятность успешной беременности значимо выше, чем у остальных (37,9% против 15,0% соответственно, $p < 0,05$). Несмотря на статистически значимый результат при прямом сравнении двух групп пациенток, значимость IL-18 как одиночного биомаркера РЭ остается низкой. Тем не менее в отличие от hDP 200, IL-18 все же нашел место в будущих исследованиях РЭ со множественными биомаркерами, которые будут обсуждены далее.

1.3.1.3 Обогащенный лейцином $\alpha 2$ -гликопротеин

Обогащенный лейцином $\alpha 2$ -гликопротеин (англ. – leucine-rich $\alpha 2$ -glycoprotein, LRG) известен благодаря своей роли в регуляции миграции иммунных клеток, реэпителизации и ангиогенезе [110]. Степень вовлеченности LRG в регуляцию РЭ неизвестна, однако существуют косвенные данные о его роли в процессах имплантации и децидуализации [165]. На основании этого в 2008 году D. Gillot и соавт. провели небольшое исследование, включившее 31 пациентку, проходящую неуточненное лечение бесплодия в ВРТ-клинике [66]. Авторы продемонстрировали статистически значимое преобладание изоформ LRG III и IV ($p < 0,01$) в эндометриальных смывах женщин с независимой от лечения беременностью ($n=3$), в сравнении с теми, кто не забеременел ($n=25$) и забеременел в ходе терапии ($n=3$). Последующие работы по изучению LRG как маркера РЭ не проводились.

1.3.1.4 Урокортин

Урокортин – это пептид, вырабатываемый люминальными и glandулярными эпителиоцитами человеческого эндометрия [57]. Структурно он во многом схож с кортиколиберином, также они частично делят одни и те же рецепторы [140]. Существуют доказательства того, что урокортин может играть некоторую роль в децидуализации и эндометриальном иммунном ответе, индуцируя экспрессию ряда цитокинов [126, 168]. P. Florio и соавт. в 2008 году провели проспективное контролируемое исследование ($n=71$), посвященное оценке прогностического

потенциала урокортина в отношении исхода ВМИ [59]. Эндометриальные смывы были получены перед ВМИ в перiovуляторную фазу. Уровни урокортина оказались статистически значимо выше у забеременевших пациенток, чем у остальных (0,38 против 0,13 нг/мл, $p < 0,001$). ROC-анализ (от англ. – receiver operating characteristic), проведенный авторами, показал, что при пороговом значении в 0,321 нг/мл данный биомаркер характеризуется чувствительностью 60,7% и специфичностью 97,7% с площадью под ROC-кривой (AUC-ROC) 0,88. Несмотря на крайне многообещающие результаты данного исследования, дальнейшие попытки изучить урокортин в отношении РЭ не предпринимались.

1.3.1.5 Активин А

В отличие от ранее обсужденных биомаркеров, вовлеченность активина А в ключевые процессы, связанные с работой эндометрия, продемонстрирована во множестве *in vitro* и *in vivo* исследований [58, 86, 134]. Данный гликопротеин принадлежит к суперсемейству трансформирующего фактора β и преимущественно экспрессируется именно в ткани репродуктивных органов; у женщин его функции включают стимуляцию децидуализации, инвазию трофобластов, дифференциацию эмбриона, защиту мозга зародыша от гипоксии [30]. Ввиду наличия убедительных данных о важной роли активина А в процессе имплантации Р. Florio и соавт. в 2010 году провели исследование, посвященное определению возможности использования данного биомаркера для анализа РЭ у пациенток, проходящих ВМИ [60]. Смывы из эндометрия были получены во время перiovуляторной фазы в день назначения человеческого хорионического гонадотропина. Уровни активина А были статистически значимо выше у забеременевших пациенток при сравнении с теми, кто не забеременел в ходе ВМИ (0,800 против 0,022 нг/мл соответственно, $p < 0,001$). В соответствии с результатами ROC-анализа данный биомаркер характеризовался чувствительностью 76%, специфичностью 100% и AUC-ROC 0,926 (при пороговом значении 0,04 нг/мл). Таким образом, активин А продемонстрировал существенный прогностический

потенциал в отношении успеха имплантации у пациенток, проходящих ВМИ. Тем не менее другие исследования с участием данного биомаркера РЭ не проводились.

1.3.1.6 Гликоделин

Гликоделин является секреторным гликопротеином, который преимущественно экспрессируется в различных тканях мужской и женской репродуктивных систем [171]. Гликоделин также часто называют «плацентарный белок 14» в соответствии с названием данным ему при первичном обнаружении в амниотической жидкости [96]. В человеческом организме данный белок представлен 4 гликоформами (гликоделин-А, -S, -F, -C), обладающими разными функциями, включая взаимодействие со сперматозоидами, адгезию эндометриальных клеток к эмбриону, супрессию цитотоксичности натуральных киллеров [171]. Было продемонстрировано, что экспрессия гликоделина в ткани эндометрия существенно повышается при пиковых значениях эстрадиола и прогестерона во время пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) – именно это время многие авторы расценивают как окно имплантации [89]. На основании этих данных U. Ventin-Ley и соавт. в 2011 году провели исследование (n=96), посвященное изучению гликоделина в качестве биомаркера РЭ [27]. Эндометриальные смывы были получены на 1-й и 7-й дни после пика ЛГ (ЛГ+1 и ЛГ+7 соответственно). В день ЛГ+7 какой-либо статистически значимый результат в отношении уровня гликоделина в фертильной группе не был обнаружен, в то время как в день ЛГ+1 уровни гликоделина были статистически значимо понижены у фертильных пациенток при сравнении с нефертильными. Тем не менее ROC-анализ продемонстрировал низкую классифицирующую способность этого биомаркера в день ЛГ+1 (AUC-ROC 0,58).

1.3.2 Исследования множественных биомаркеров в эндометриальной жидкости

Результаты исследований, посвященных анализу множественных биомаркеров РЭ в эндометриальной жидкости, суммированы в Приложении А

Таблице 2. В этих работах орошение полости матки физиологическим раствором не было единственным способом сбора биоматериала, так как появился новый подход – прямая аспирация небольшого объема эндометриального секрета. В данной категории исследований все авторы проводили забор биоматериала в день ПЭ непосредственно перед процедурой. Разработка основанных на магнитных частицах мультиплексных иммунных аналитических подходов позволила проводить количественное определение до 100 аналитов в одном образце объемом от 50 мкл [75]. Ожидалось, что подобные технологии будут превалировать в исследованиях, направленных на анализ множества биомаркеров, однако мультиплексный подход был использован лишь единожды [31].

1.3.2.1 Цитокины

За последние 20 лет было проведено множество исследований, посвященных анализу глобальных паттернов экспрессии, необходимому для описания вариабельности транскриптома на разных стадиях менструального цикла [90, 99, 178]. Для всех обсуждаемых далее цитокинов существуют убедительные доказательства изменения экспрессии либо в окне имплантации, либо у пациенток с бесплодием. Известно, что цитокины в той или иной степени опосредуют все процессы имплантации и эмбрионально-эндометриального взаимодействия [116]. Таким образом, выбор цитокинов в качестве биомаркеров РЭ представляется вполне обоснованным и не подвергается сомнению.

Первым исследованием, нацеленным на изучение возможности более чем одного биомаркера отражать статус РЭ, была работа N. Lédée-Bataille и соавт. 2002 г. (n=33) [100]. Избранными цитокинами были лейкемия-ингибирующий фактор (англ. – Leukemia inhibitory factor, LIF) и фактор некроза опухоли α (англ. – Tumor necrosis factor α , TNF- α). Их уровни были оценены в эндометриальных смывах, полученных от пациенток, проходящих цикл ЭКО или ВМИ. Статистически значимая разница была обнаружена только для концентрации LIF, которая отличалась у забеременевших (0 (0-177) пг/мл) и у тех, у кого беременность не наступила (203 (0-1620) пг/мл), $p < 0,01$. Такие результаты оказались неожиданными

для авторов, так как изначально они ожидали результатов, схожих с таковыми в исследовании С. Laird и соавт., которые продемонстрировали, что уровни LIF значимо повышены у фертильных пациенток при сравнении с нефертильными [98]. К сожалению, данных о прогностической ценности LIF как биомаркера успешных ЭКО и ВМИ авторами не предоставлено.

Следующее исследование было проведено С. Boomsma и соавт. в 2009 г. (n=210), именно в нем авторы использовали вышеупомянутую мультиплексную технологию, которая позволила в одном образце одновременно анализировать уровни 17 цитокинов [31]. Эндометриальная жидкость была собрана при помощи прямой аспирации в объеме 1-4 мкл у пациенток, проходящих цикл ЭКО/ИКСИ. Мультиплексная система детекции цитокинов включала: IL-1 β , IL-5 (исключен из анализа из-за крайне редкого выявления), IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α , интерферон γ (англ. – Interferon, IFN- γ , не был обнаружен ни в одном из образцов), фактор ингибирования миграции макрофагов (Macrophage migration inhibitory factor, MIF), Eotaxin, ИФН γ -индуцируемый 10 кДа белок (англ. – IFN- γ -inducible 10 kDa protein, IP-10), моноцитарный хемотаксический белок 1 (англ. – Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), Dickkopf гомолог 1, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (исключен из анализа из-за крайне редкого выявления), фактор роста эндотелия сосудов (англ. – Vascular endothelial growth factor, VEGF). Мультивариабельная логистическая регрессия продемонстрировала статистически значимую ассоциацию MCP-1 (p<0,01) и IP-10 (p<0,05) с успешной имплантацией, а также ассоциацию IL-1 β (p<0,05) и TNF- α (p<0,05) с наступлением клинической беременности. Впрочем, AUC-ROC для IL-1 β и TNF- α в качестве биомаркеров РЭ оказалась неудовлетворительной (0,61), включение морфологического качества эмбриона слегка, хоть и недостаточно, улучшило модель (0,67).

Несколько позже было проведено 2 сравнительно небольших исследования, направленных на то, чтобы подтвердить результаты С. Boomsma и соавт. [92, 136]. Оба исследования включили пациенток, проходящих курс ЭКО. N. Khadem и соавт. (n=76) анализировали уровни IL-1 β и TNF- α в эндометриальных смывах, в то время

как М. Rahiminejad и соавт. (n=50) проводили количественное определение IL-1 β , TNF- α , IP-10 и MCP-1 в прямых аспиратах эндометриального секрета. В отличие от С. Boomsma и соавт., которые для статистической обработки результатов использовали многофакторный подход, в данной паре исследований прогностическая сила биомаркеров оценивалась индивидуально для каждого анализита при сравнении пациенток с разными исходами ЭКО. Таким образом, для дальнейшего обсуждения результатов следует отметить, что С. Boomsma и соавт. применяли более жесткие критерии для выявления статистической значимости, учитывая многофакторный характер анализа.

М. Rahiminejad и соавт. продемонстрировали, что уровни TNF- α были понижены в группе забеременевших пациенток ($p<0,01$), что противоречило результатам N. Khadem и соавт. В обоих исследованиях для IL-1 β не было обнаружено статистически значимого результата. Наконец, IP-10 и MCP-1 в работе N. Khadem и соавт. были значимо повышены в группе с успешным исходом ЭКО ($p<0,01$), что согласуется с результатами С. Boomsma и соавт.

Таким образом, несомненно, цитокины так или иначе вовлечены в процесс регуляции РЭ, но их взаимодействие и взаимная регуляция весьма комплексны, поэтому многофакторный подход к анализу биомаркеров РЭ представляется более подходящим, как было описано выше. Современный рынок лабораторного оборудования и реагентов предлагает разнообразные опции для скрининга цитокинов – вплоть до заранее готовых наборов для определения 48 и более цитокинов мультиплексным методом. К сожалению, на данный момент лишь малая часть многообещающих цитокинов была изучена в эндометриальной жидкости, необходимы крупные исследования, включающие дополнительные аналитические мишени.

1.3.2.2 Биомаркеры оксидативного стресса

Под оксидативным стрессом понимают нарушение баланса свободных радикалов и антиоксидантов в рассматриваемой среде [85]. Роль оксидативного стресса в самых разных патологических состояниях не вызывает сомнений и по-

прежнему активно изучается [159]. Клетки эндометрия также могут повреждаться свободными радикалами, что, по мнению некоторых авторов, может приводить к понижению РЭ [181]. Rahiminejad и соавт. в 2016 г. провели исследование, посвященное анализу наиболее распространенных биомаркеров оксидативного стресса в эндометриальной жидкости, полученной при помощи прямой аспирации в день ПЭ у пациенток ($n=100$), проходящих цикл ЭКО/ИКСИ [137]. Объектами анализа были: активность супероксид дисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), пероксидация липидов (ПОЛ), общий уровень тиоловых групп (ОТГ) и общая антиоксидантная сила (ОАС). Статистически значимая разница между пациентками с успешным и неуспешным исходами ЭКО/ИКСИ была получена для СОД, КАТ, ПОЛ, ОАС ($p<0,01$). ROC-анализ продемонстрировал умеренную предиктивную силу в отношении исхода ЭКО/ИКСИ для индивидуальных уровней КАТ, ОАС и СОД (площади под ROC-кривой 0,766, 0,788 и 0,711 соответственно). К сожалению, авторами не была предложена многофакторная модель, включающая комбинацию наиболее перспективных биомаркеров оксидативного стресса. Так или иначе, в данной работе было продемонстрировано, что данный тип биомаркеров является весьма многообещающим в отношении изучения РЭ, однако требуются дополнительные исследования.

1.4 Время и способ сбора эндометриальной жидкости

В соответствии с методологией обсужденных исследований существует 2 основных подхода к сбору эндометриальной жидкости: орошение полости матки физиологическим раствором с последующим забором смывов и прямая аспирация эндометриального секрета. При обсуждении подходов к сбору биоматериала из матки Y. Cheong и соавт. отметили, что смывы во многом уступают прямой аспирации, так как большой объем орошающей жидкости приводит к более сильному разведению биоматериала, а объем жидкости, утекшей по фаллопиевым трубам, трудно стандартизовать для сравнения образцов друг с другом [43]. Действительно, в обсужденных ранее исследованиях средний объем жидкости для орошения составил 2 мл, в то время как при прямой аспирации биоматериал

разводится 70 мкл физиологического раствора. Тем не менее степень разведения биоматериала между образцами сложно сравнить в обоих случаях, так как при прямой аспирации объем секрета варьировал от 1 до 4 мкл, по данным С. Boomsma и соавт., в результате чего авторам пришлось нормализовать все результаты количественного определения по общему уровню белка [31]. Важно отметить, что подобная нормализация не использовалась в остальных приведенных в данном обзоре исследованиях.

Сильное разведение, имеющее место при получении смывов из полости матки, приводит к тому, что исследователям приходится работать в области низких концентраций, граничащих с пределом детектирования используемых иммунологических методов, в то время как большинство авторов не предоставляли данные о линейности измерения в области низких концентраций.

В свете этих рассуждений представляет интерес сравнение результатов количественного определения IL-18 в эндометриальных смывах и в прямых аспиратах [31, 101]. В исследовании N. Lédée-Bataille и соавт. в смывах из полости матки детектируемый уровень IL-18 был лишь у 38 из 133 пациенток, и частота наступления беременности у таких пациенток значимо отличалась от тех, у кого уровень IL-18 был ниже порога детектирования ($p < 0,05$). В то время как в исследовании С. Boomsma и соавт. в прямых аспиратах из эндометрия IL-18 выявлялся у всех пациенток ($n=210$), статистически значимых отличий обнаружено не было. Несмотря на то, что в последнем исследовании использовался подход с более низким порогом детектирования, несоответствие результатов в этих двух исследованиях в первую очередь может объясняться более сильным разведением при получении смывов.

В рассмотренных исследованиях момент сбора биоматериала в менструальном цикле существенно разнился. В большинстве случаев именно день ПЭ был избран в качестве точки сбора эндометриальной жидкости, ведь, действительно, это время представляется наиболее информативным с точки зрения исхода ВРТ. Тем не менее такой подход обладает малой прогностической ценностью для клиницистов, потому что все манипуляции в рамках избранной ВРТ

будут завершены к моменту получения данных о биомаркерах в эндометриальной жидкости. А в настоящее время данных о том, что уровни биомаркеров сохраняются от цикла к циклу, нет. Таким образом, для реального клинического использования, возможно, в большей степени подходит начало целевого менструального цикла или все же предыдущий цикл при условии, что будет доказано отсутствие вариабельности уровней биомаркеров от цикла к циклу.

1.5 Цервикагинальные смывы

Явным преимуществом цервикагинальных смывов над эндометриальной жидкостью является то, что сбор такого типа биоматериала несравнимо проще и менее инвазивен. Важно отметить, что, по данным С. Voortsma и соавт. (n=22), цервикальный секрет имеет отличный от эндометриального цитокиновый профиль [32]. Впрочем, это не означает, что цервикагинальные смывы вовсе не пригодны для оценки РЭ. В исследовании N. Zanotta и соавт. 2018 г. (n=155) при помощи мультиплексного подхода анализировалась широкая панель из 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста в цервикагинальных смывах, полученных непосредственно перед забором ооцитов от пациенток, проходящих цикл ЭКО [188]. Логистическая регрессия выявила 4 провоспалительных фактора статистически значимо повышенных у пациенток, успешно достигших клинической беременности (IL-12p40, IFN α , MIF и MCP-3, $p < 0,001$). К сожалению, авторы не предоставили количественных данных о предсказательной силе данных биомаркеров в отношении исхода ЭКО. Тем не менее эти результаты демонстрируют потенциал цервикагинального секрета в качестве биологического субстрата для изучения РЭ. Необходимы дополнительные исследования с использованием этого неинвазивно получаемого биоматериала.

1.6 Остаточные клетки на катетере для переноса эмбрионов

Клетки эпителия эндометрия, собранные непосредственно при ПЭ, скорее всего являются наиболее информативным биоматериалом для изучения РЭ. Впрочем, как было отмечено ранее, проведение травмирующей биопсии

эндометрия непосредственно перед (или после) ПЭ невозможно. Весьма изобретательное решение проблемы было предложено F. Camargo-Díaz и соавт. (n=76), которые использовали клетки и слизь из эндометрия, прикрепившиеся к катетеру для ПЭ при контакте с тканью, после проведения самой процедуры для анализа РЭ [37]. Окраска с использованием гематоксилина и эозина при микроскопическом исследовании подтвердила, что остаточные клетки действительно принадлежат эндометрию. Авторы изолировали РНК из смеси остаточных клеток и слизи из эндометрия, а затем определяли уровни РНК муцина-1, гомеобокса A10, LIF и макрофагального колониестимулирующего фактора (англ. – Macrophage colony stimulating factor, M-CSF). Эти мишени были выбраны, исходя из данных об изменении профиля их экспрессии у пациенток с бесплодием [130]. Авторы продемонстрировали, что уровни экспрессии LIF и M-CSF были статистически значимо повышены у пациенток с успешным исходом ЭКО ($p < 0,05$). Повышение экспрессии LIF противоречит результатам, полученным N. Lédée-Bataille и соавт. и обсужденным ранее, но в то же время это подтверждает результаты C. Laird и соавт., сравнивавших фертильных и нефертильных пациенток [98, 100]. Таким образом, данные о взаимосвязи уровня LIF и РЭ противоречивы, требуются дополнительные исследования.

1.7 Менструальная кровь

Менструальная кровь активно изучается в качестве источника стволовых клеток, которые находят применение в регенеративной медицине, однако данные об использовании этого биоматериала в качестве диагностического субстрата весьма ограничены [34]. Менструальная кровь обладает рядом преимуществ над эндометриальной жидкостью, так как она отражает молекулярное микроокружение как слизистой матки, так и кровоснабжения самой ткани. Шейка матки во время менструации размягчается, цервикальный канал становится проходимым, и забор данного биоматериала непосредственно из полости матки прост и безболезнен. Главным недостатком менструальной крови является то, что она может быть

собрана только в относительно короткий период цикла, который весьма отдален от дня непосредственной имплантации.

В настоящее время менструальная кровь еще не была использована для оценки РЭ, однако С. Tortorella и соавт. успешно попытались определить уровни 3 распространенных провоспалительных цитокинов в этом биоматериале (IL-1 β , IL-6, TNF- α) у 64 пациенток с бесплодием для того, чтобы разработать новый подход к диагностике ХЭ [169]. Известно, что ХЭ превалирует у пациенток с бесплодием, повторяющимися нарушениями имплантации и выкидышами, однако клиническая значимость данного состояния остается предметом споров [45]. Недавний мета-анализ, призванный оценить влияние терапии антибиотиками ХЭ на исход ЭКО, подтвердил, что гистологическое подтверждение излечения ХЭ после курса антибиотиков действительно статистически значимо повышает шансы на клиническую беременность и деторождение при сравнении с пациентками с персистирующим ХЭ [172].

С. Tortorella и соавт. продемонстрировали, что все 3 изученных провоспалительных цитокина были статистически значимо повышены у женщин с гистологически подтвержденным ХЭ ($p < 0,001$). По результатам ROC-анализа диагностическая модель, основанная на отношении IL-6 к TNF- α , является эффективным предиктором ХЭ с чувствительностью 91,7% и специфичностью 96,4% (AUC-ROC 0,989). В соответствии с данными результатами менструальная кровь является многообещающим субстратом для анализа различных биомаркеров, возможность ее использования для оценки РЭ необходимо подтвердить в будущих исследованиях.

1.8 Ультразвуковые биомаркеры рецептивности эндометрия

Известно, что для достижения оптимальной РЭ необходимо, чтобы эндометрий прошел ряд гистологических изменений, а также увеличился в толщине [8, 9]. В то время как гистологические изменения детектируемы только с помощью биоматериала, собранного в ходе биопсии, ультразвуковое исследование позволяет неинвазивно оценивать такие параметры, как толщину эндометрия, его

паттерн и объем [3, 6, 12]. Сравнительная простота изучения вышеперечисленных характеристик эндометрия позволила им получить широкое распространение. Стоит отметить, что данные параметры являются суррогатными по отношению к РЭ, другими словами, ожидать, что они смогут предсказывать исход имплантации с высокой точностью, не приходится [14]. Впрочем, они могут использоваться в качестве индикаторов РЭ, ниже будет обсужден прогностический потенциал в отношении исхода ВРТ-лечения каждого из вышеназванных ультразвуковых параметра эндометрия по отдельности.

1.8.1 Толщина эндометрия

Как правило, толщина эндометрия измеряется в средне-сагиттальной плоскости от внешнего края эндометриально-миометриального соединения в ходе 2D-ультразвукового исследования [18, 53, 127, 141]. Результаты измерения толщины эндометрия (и как следствие его прогностическая значимость) во многом зависят от выбранного для исследования временного интервала в рамках менструального цикла. Большинство авторов измеряют данный параметр в день индукции овуляции (вызванной введением человеческого хорионического гонадотропина). Однако из-за того, что эндометрий находится под постоянным влиянием ряда гормонов на самом деле он изменяется непрерывно и может расти даже после овуляции в естественном цикле [147]. Это может указывать на то, что конкретный день менструального цикла, выбранный для исследования, может влиять на результаты анализа.

Результаты исследований по оценке прогностического потенциала измерения толщины эндометрия весьма противоречивы. Так, в работе М. Kehila и соавт. было продемонстрировано, что вероятность наступления беременности статистически значимо ассоциирована с данным параметром (при его измерении до индукции овуляции) [91]. Авторы утверждают, что при толщине эндометрия более 12 мм шансы забеременеть увеличиваются втрое. Схожие результаты были получены в исследовании G. Vozdag и соавт., которые также обнаружили, что при толщине эндометрия более 14 мм, измеренной в день назначения человеческого

хорионического гонадотропина, существенно увеличивается вероятность успешного исхода ПЭ [33].

В то же время в ряде исследований не были установлены ни корреляция частоты наступления клинической беременности с толщиной эндометрия, измеренной в тот же день, что и в ранее упомянутых работах [47, 138, 185], ни хоть какое-либо статистически значимое различие по данному параметру между группами пациенток, забеременевшими и не забеременевшими в результате ВРТ-лечения [48, 105, 117, 157].

Некоторые авторы изучали прогностический потенциал измерения толщины эндометрия в день забора ооцитов. В наиболее ранних работах было показано, что данный параметр может быть ассоциирован с исходом ПЭ [28, 68]. Однако позже это было опровергнуто рядом исследователей [25, 80, 105, 179].

Наконец, наиболее поздним моментом для измерения толщины эндометрия, разумеется, является день ПЭ. Р. Kovacs и соавт. продемонстрировали, что данный параметр был выше в группе забеременевших пациенток [95]. И вновь несколько позже появились работы с противоречащими результатами [25, 93].

1.8.2 Объем эндометрия

Противоречивые результаты применения измерения толщины эндометрия для прогнозирования исхода ВРТ-лечения сподвигли научное сообщество искать альтернативные подходы к оценке состояния эндометрия в ходе ультразвукового исследования [5]. Так, Е. Kovachev и соавт. применили 3D-ультразвуковое исследование для оценки объема эндометрия в день ПЭ и обнаружили, что объем менее 2 мл был значимо ассоциирован со сниженной вероятностью успеха имплантации [94]. В то же время I. Jarvela и соавт. продемонстрировали, что данный параметр, наоборот значимо уменьшается после назначения человеческого хорионического гонадотропина (однако лишь в группе забеременевших), а также что объем эндометрия, измеренный в день аспирации ооцитов, не был ассоциирован с исходом ПЭ [80], что подтверждается еще в некоторых исследованиях [153, 154].

1.8.3 Паттерн эндометрия

Под паттерном эндометрия понимают его качественную эхоструктуру на «серой шкале» при ультразвуковом исследовании [162]. Как правило, авторы выделяют два отличающихся паттерна: «гомогенная эхоструктура» (монослойный эндометрий) и «трехслойная эхоструктура» [7, 42, 160]. В. Welker и соавт. продемонстрировали, что паттерн эндометрия, измеренный в день аспирации ооцитов значимо ассоциирован с исходом ПЭ, в то время как в том же исследовании толщина эндометрия не оказалась значимой [179]. Еще в одном исследовании у забеременевших в результате ВРТ-лечения женщин чаще выявлялась трехслойная эхоструктура эндометрия [68]. В скором времени эти результаты были поддержаны G. Sher и соавт., которые продемонстрировали, что комбинация оценки паттерна эндометрия с его толщиной может иметь даже большую значимость [158].

Впрочем, как и в случае со всеми описанными ранее ультразвуковыми параметрами эндометрия есть довольно много работ с отрицательными результатами [28, 138, 160].

1.8.4 Значимость средних значений ультразвуковых биомаркеров

В недавнем мета-анализе L. Craciunas и соавт. было продемонстрировано, что хоть и все обсужденные выше ультразвуковые параметры эндометрия в тех или иных подгруппах оказываются статистически значимо ассоциированы с исходом ВРТ-лечения, их прогностический потенциал оказывается довольно низок даже в этих подгруппах (AUC-ROC около 0,6) [49]. Это же по большей части касается и прочих ранее неупомянутых ультразвуковых параметров (по причине не столько большой распространенности в литературе), получаемых, например, при доплерографии сосудов матки [177].

В мета-анализе L. Craciunas и соавт. было показано, что средняя разница в толщине эндометрия между забеременевшими и незабеременевшими пациентками варьировала от -0,5 до 1,16 мм (в зависимости от типа ВРТ, дня измерения и прочих факторов) [49]. Несмотря на то, что эта крайне низкая разница в некоторых

подгруппах оказывалась статистически значимой, клиническая применимость остается весьма ограниченной. При сравнении средних (или медианных) значений этого параметра, которые и подразумеваются при обработке данных клинических исследований, может быть сделан вывод, что при прогнозировании исхода ВРТ-лечения подобные ультразвуковые биомаркеры совершенно не являются ценными. Однако в мета-анализе было продемонстрировано, что при введении разнообразных пороговых значений толщины эндометрия наблюдался градиент ассоциативной связи данного параметра с шансами забеременеть вплоть до порогового значения в 6 мм (хотя встречаемость столь тонкого эндометрия была равна всего лишь 0,33%). Таким образом, средние значения, характеризующие популяцию в целом, менее применимы в исследованиях с использованием ультразвуковых биомаркеров, тогда как наиболее значимые результаты могут быть достигнуты при изучении пациенток с экстремальными значениями этих параметров.

1.9 Микробиота эндометрия

Человеческие клетки составляют примерно половину общего количества клеток в теле человека, тогда как оставшуюся половину – клетки микроорганизмов. Согласно недавним подсчетам, в человеке весом 70 кг общее количество бактерий составляет примерно $3,8 \times 10^{13}$, а их масса примерно – 0,2 кг [155]. Желудочно-кишечный тракт является самым густонаселенным бактериями отделом организма человека (~80% общего количества микроорганизмов в теле человека), вторым по численности является мочеполовой аппарат (~9%) [133].

Человек коэволюционировал как биологический вид вместе с различными бактериями и вирусами, что привело к тому, что нормальное функционирование организма напрямую зависит от правильной внутренней микробной среды. К примеру, широко известно, что микробиота кишечника играет важную роль в метаболизме питательных веществ, ксенобиотиков и лекарств, принимаемых человеком, а также в защите от патогенов [11, 79]. Более того, анализ микробиоты

кишечника является рутинным анализом в диагностике различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, как отмечается в клинических рекомендациях [16].

Вполне возможно, что подобная ситуация может наблюдаться и в случае взаимодействия микробиоты и эндометрия. Впрочем, в настоящий момент алгоритм обследования при бесплодии не включает в себя исследование микроорганизмов полости матки [10]. Обычно микробиологический анализ ограничивается анализом мазков влагалища или шейки матки. Существует несколько причин, по которым исследование эндометриальной микробиоты может не рассматриваться в клиническом контексте. Во-первых, долгие годы эндометрий считался стерильной средой, а шейка матки – непреодолимым барьером для патогенов [36, 167]. Во-вторых, любой метод получения образца эндометрия является инвазивным, тем более при сравнении с методами взятия биоматериала из нижних отделов репродуктивного тракта. В-третьих, даже несмотря на растущий объем данных о нестерильности полости матки, результаты последних исследований, изучавших связь определенного микробиологического профиля эндометрия с нарушениями рецептивности эндометрия, были противоречивыми [4, 52, 61, 97, 122], а мета-анализы по данной теме еще не проводились. Более того, на данный момент даже нет консенсуса в отношении микробиологического профиля при таком распространенном заболевании, как ХЭ, поскольку были обнаружены несоответствия в полученных результатах различных исследований о составе микробиоты эндометрия у пациенток с этим заболеванием [13, 15, 41, 52, 112]. В-четвертых, есть мнение, что отсутствует смысл изучать микробиоту эндометрия, так как при заборе образца происходит контаминация из нижних отделов репродуктивного тракта. Другими словами, микробиота влагалища или шейки матки потенциально может отражать микробиоту эндометрия.

1.9.1 Представители эндометриальной микробиоты

В ряде исследований было продемонстрировано, что у условно здоровых пациенток микробиота матки в основном представлена бактериями рода

Lactobacillus [112]. При исследовании образцов эндометрия, полученных от 58 пациенток, проходящих гистерэктомию, не связанную с онкологией, С. Mitchell и соавт. обнаружили, что в 95% случаев основными представителями микробиоты были *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus* и *Prevotella* spp. [119]. Еще среди часто выявляемых родов бактерий в эндометрии можно выделить *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Prevotella* и *Streptococcus* [121].

Некоторыми исследователями было предложено выделять два основных типа микробиоты матки: доминируемый *Lactobacillus* spp. (обсемененность более 90%) и не доминируемый *Lactobacillus* spp. [121]. Существуют и данные, что обсемененность *Lactobacillus* spp. отрицательно коррелирует с таковой для *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, и в то же время положительно – с обсемененностью такими комменсалами, как *Streptomyces* spp. [122].

Впрочем, существуют и противоречащие этим данные. В двух исследованиях в китайской популяции было показано, что *Lactobacillus* spp. не являются наиболее часто встречающимся таксоном в матке: эндометрий был преимущественно обсеменен представителями таких родов, как *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* и *Vagococcus*, и таких семейств, как Moraxellaceae, Propionibacteriaceae, Pseudomonadaceae и Streptococcaceae [40, 107]. Еще в одном исследовании было продемонстрировано, что ядро эндометриальной микробиоты может быть представлено бактериями таких родов, как *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Escherichia*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*, тогда как *Lactobacillus* встречались и вовсе лишь у 20% пациенток [104].

Столь противоречивые данные во многом могут являться следствием выраженной методологической гетерогенности упомянутых исследований, включая способ взятия биоматериала и подход к микробиологическому анализу. Так, например, в работе L. Riganelli и соавт. было показано, что микробиота эндометрия у пациенток, проходящих ВРТ-лечение, в основном представлена *Kocuria dechangensis*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Delftia tsuruhatensis* и *Cutibacterium acnes*, тогда как известно, что часть этих организмов зачастую встречается в почве и воде,

подчеркивая возможность контаминации при микробиологическом анализе, чему особо подвержены аналитические подходы, основанные на секвенировании 16S рибосомальной РНК (рРНК) [142].

В недавнем исследовании, посвященном глобальному микробиологическому картированию биоматериала из матки, было установлено, что бактерии составляют лишь 85% микробиологического сообщества эндометрия, тогда как остальную его часть представляют грибы (10%), вирусы (5%) и археи (0,3%) [163]. Таким образом, изучение микробиоты эндометрия не должно ограничиваться анализом лишь ее бактериального компонента.

1.9.2 Препятствия на пути изучения микробиоты эндометрия

Отсутствие консенсуса не только по влиянию микробиоты на РЭ, но и даже по ее составу в эндометрии в принципе может быть следствием ряда ограничений проведенных на сегодняшний день исследований. Ключевой проблемой является тот факт, что взятие биоматериала из эндометрия является весьма инвазивной процедурой (за исключением сбора менструальной крови из полости матки, которому и посвящена настоящая работа, однако исследований, посвященных ее микробиологическому профилированию на сегодняшний день, кроме представленного в данной работе, не существует). Это относится как к трансцервикальному сбору биоматериала, так и еще в большей степени к сбору образцов при хирургическом вмешательстве. Данное ограничение приводит к тому, что во всех доступных исследованиях выборка пациенток является сравнительно небольшой.

Не менее важными являются демографические характеристики изучаемой когорты, такие как этническая принадлежность и возраст. В некоторых исследованиях было показано, что данные факторы могут обладать определенным влиянием на флуктуации в составе микробиоты на разных участках организма, включая матку [63, 132, 176]. Например, известно, что у чернокожих пациенток из США микробиологический профиль влагалища значительно отличается от такового у белых пациенток из тех же регионов [125]. Эти наблюдения подчеркивают

необходимость учета подобных факторов при сопоставлении результатов различных исследований, посвященных анализу микробиоты женского полового тракта.

Существует мнение, что необходимо учитывать не только наличие антибиотической и пробиотической терапии (как это было в настоящем исследовании), но и гормональную терапию, а также даже наличие противозачаточных внутриматочных спиралей, которые могут оказывать влияние на параметры микробиоты [17, 38, 88]. Впрочем, данные о влиянии гормональной терапии на микробиологический профиль эндометрия весьма ограничены и основаны на сравнении групп пациенток с разной терапией, тогда как изучение флуктуации микробиоты у одних и тех же пациенток затруднено, так как оно бы подразумевало многократное взятие биоматериала из эндометрия за короткий промежуток времени без наличия на то прямых медицинских показаний.

Помимо обсужденных выше интериндивидуальных различий, возможно, необходимо учитывать и интраиндивидуальные. Так, существуют данные о том, что структура микробиоты может меняться в зависимости от дня цикла [40, 63]. Впрочем, стоит отметить, что эти результаты также основаны на сравнении разных групп пациенток, что затрудняет их интерпретацию.

Главным же препятствием при изучении непосредственного влияния состава микробиоты эндометрия на его рецептивность является подбор группы сравнения (контроля). Наиболее объективным способом оценки РЭ является регистрация факта наступления клинической беременности в ходе ВРТ-лечения или попытки естественного зачатия. Однако неудачный исход может быть обусловлен и эмбриональным фактором (или даже техническим в случае ВРТ). Современные методы морфологической и генетической оценки качества эмбриона все же не подразумевают однозначную гарантию отсутствия того или иного нарушения. Подобная проблема относится к любым исследованиям РЭ и не ограничивается микробиологическими. Наиболее очевидным способом нивелирования ее влияния является анализ больших групп пациенток, что не всегда возможно, учитывая высокую инвазивность любого сбора биоматериала из эндометрия (за

исключением представленного в настоящем исследовании сбора менструальной крови из полости матки). В большинстве рассмотренных исследований группы весьма ограничены и включают 30-60 пациенток, что существенно снижает статистическую силу анализа [120].

Наконец, результаты анализа микробиоты эндометрия могут быть искажены в связи с так называемыми проблемами «китома» и «сплэшом» [128, 131, 149]. Под термином «китом» понимают совокупность микробиоты лабораторного оборудования, реагентов и расходуемых материалов. А под термином «сплэшом» – совокупность микробиоты, заносимой в анализируемую ячейку планшета из соседних ячеек планшета от других пациентов в ходе пипетирования и образования микробрызг. Данные проблемы не являются принципиальными при рутинном клиническом анализе с помощью генетических методов, когда пороговое значения флуоресценции в ходе полимеразной цепной реакции стоит относительно высоко, в то время как микробиоту женского полового тракта изучают при помощи мазков или соскобов из нижних отделов, где общая бактериальная масса является довольно высокой. Однако в случае с анализом микробиоты эндометрия общая бактериальная масса довольно ничтожна, и в то же время аналитические подходы, основанные на секвенировании 16S рРНК, обладают крайне высокой чувствительностью [26, 182]. Совокупность этих факторов приводит к тому, что зачастую в исследованиях, посвященных анализу микробиоты эндометрия, выявляются микроорганизмы совершенно не характерные для такой среды, как человеческий организм, что было отмечено ранее [142]. Контроль абсолютно всех источников контаминации на разных этапах работы с образцами весьма сложен, тем не менее крайне необходимо проводить параллельный анализ достаточного числа отрицательных контролей, введенных на наиболее уязвимых этапах лабораторной работы (выделение ДНК и пипетирование соответствующих образцов ДНК) [120].

Таким образом, несмотря на то что появляется все больше сведений о роли эндометриальной микробиоты в развитии различных гинекологических и акушерских состояний [1, 2], до сих пор отсутствует консенсус о ее нормальном

составе. Для сопоставления результатов исследований необходимы более стандартизированные аналитические протоколы, а также расширение когорт пациенток.

Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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 подразумевала 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. Включение пациенток в исследование осуществлялось в Институте репродуктивной медицины «РЕМЕДИ», тогда как все процедуры, связанные с анализом биоматериала в рамках научного исследования, проводились в Медицинском научно-образовательном центре Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Совместная работа организаций выполнялась в соответствии с договором о научном сотрудничестве.

Данное исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол №12/20, датирован 20.12.2020) и было проведено в соответствии с принципами Хельсинской Декларации. Все участницы исследования подписали добровольное информированное согласие до забора биоматериала.

Включение пациенток в этап 1 производилось с декабря 2020 по июнь 2022 гг. В данный этап 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 полипов эндометрия) и иммуногистохимический (окраска по CD138) исследования препаратов эндометрия в сторонней организации (Московская

международной лаборатория патоморфологии «Лаборатуар Де Жени»). 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 [109].

Критериями исключения пациенток из исследования был прием антибиотиков или диагностированные инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) за 3 месяца до включения в исследование, а также наличие онкологических заболеваний. Клинические и демографические особенности пациенток указаны в Таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-демографическая характеристика пациенток этапа 1

Показатель	Значение
Возраст, лет	36,7 (29,0–46,0)*
Индекс массы тела, кг/м ²	22,4 (16,9–31,1)*
Хронический эндометрит	11/99**
ИППП в анамнезе	17/100
Привычное нарушение имплантации***	9/100
Факторы бесплодия	
Трубно-перитонеальный	16/100
Эндометриоз	38/100
Снижение овариального резерва	40/100
Эндокринный	22/100
Неясный генез	17/100
Маточный:	54/100
- внутриматочные синехии	7/100
- рубцы на матке	15/100
- полипы матки	42/99**

Продолжение Таблицы 1

Показатель	Значение
Привычное невынашивание***	4/100
* Данные представлены как среднее (разброс). ** Для одной пациентки данные недоступны. *** Устанавливались при наличии 3 и более в анамнезе.	

Набор пациенток в этап 2 исследования проводился с января 2021 по октябрь 2022 гг. Всего было включено 42 пациентки, которым был запланирован крио-ПЭ (как часть программы ЭКО или ЭКО/ИКСИ). Критериями исключения были такими же, как на этапе 1. Все процедуры ВРТ были выполнены в строгом соответствии с национальными клиническими рекомендациями (№ 15-4/И/2-1908 от 05.03.2019 утв. МЗ РФ). ПЭ проводился только для blastocysts качества 2BB по Гарднеру или выше. Пациентки были разделены на две группы в зависимости от исхода ПЭ. Таким образом, 19 пациенток составили группу «беременность наступила», тогда как 23 – группу «беременность не наступила». Клиническая беременность устанавливалась по уровню человеческого хорионического гонадотропина с последующим ультразвуковым подтверждением наличия одного или более плодных яиц. Также производился контроль пролонгирования беременности до 12 недель. Впрочем, оно было достигнуто абсолютно у всех пациенток из группы «беременность наступила», поэтому данный параметр не учитывался при последующей обработке данных. Клинико-демографические характеристики участниц исследования представлены в Таблице 2. Группы не различались по представленным параметрам, за исключением того, что в группе «беременность не наступила» чаще проводилось преимплантационное генетическое тестирование и встречалось СОР ($p < 0,05$).

Таблица 2 – Клинико-демографическая характеристика пациенток этапа 2

Показатель	Группа «беременность наступила»	Группа «беременность не наступила»
Возраст, лет	34,7 (19,0–50,0)*	38,3 (31,0–51,0)*
Индекс массы тела, кг/м ²	21,7 (17,3–30,5)*	21,9 (17,3–27,9)*
Привычное нарушение имплантации**	1/19	5/23
Привычное невынашивание**	0/19	1/23
Детали ВРТ		
ЭКО	12/19	9/23
ЭКО/ИКСИ	7/19	14/23
Крио-ПЭ	19/19	23/23
Цикл с заместительной гормональной терапией	18/19	23/23
Естественный цикл	1/19	0/23
Преимплантационное генетическое тестирование	6/19	13/23
Факторы бесплодия:		
Трубно-перитонеальный	5/19	3/23
Эндометриоз	3/19	8/23
Снижение овариального резерва	4/19	12/23
Эндокринный	1/19	0/23
Неясный генез	2/19	3/23
Маточный	0/19	3/23
- внутриматочные синехии	0/19	1/23
- рубцы на матке	0/19	2/23
* Данные представлены как среднее (разброс). ** Данные состояния устанавливались при наличии 3 и в анамнезе.		

2.2 Сбор образцов биоматериала

На этапе 1 исследования до проведения манипуляций по забору материала наружные половые органы пациенток обрабатывались спиртовой салфеткой. Избыток влагалищного секрета удалялся с помощью ватных тампонов. Влагалищные и цервикальные образцы были получены с использованием цитощеток.

Получение образцов производилось крайне аккуратно восходящим путем для снижения вероятности контаминации верхних отделов. Эндометриальные образцы были получены с использованием Пайпель катетера, который был введен в полость матки через наружный катетер для инсеминации для снижения вероятности контакта со слизью шейки матки.

Аспират из эндометрия был перенесен в пустые стерильные пробирки. Образцы шейки матки и влагалища были незамедлительно перенесены в стерильные пробирки, содержащие 0,5 мл раствора консерванта. До анализа все образцы хранились при температуре минус 80°C.

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. Наружные половые органы, влагалище и шейка матки дезинфицировались спреем Октенисепт (Schulke & Mayr GmbH, Нордерштедт, Германия) до введения катетера для ПЭ. Избыток влагалищного секрета также удалялся с помощью ватного тампона.

Объем аспирируемой менструальной крови было весьма гетерогенным и в большинстве случаев составлял не более 0,5 мл. Более того, из-за высокой вязкости биоматериала катетер зачастую забивался и нуждался в промывке стерильным физиологическим раствором (0,2 мл).

Образцы менструальной крови центрифугировались при 5500 об./мин в течение 10 мин. Супернатант переносился в отдельные пробирки. И супернатант, и осадок менструальной крови хранились при температуре минус 80°C.

2.3 Микробиологический анализ

После размораживания образцы эндометриального секрета доводились до объема 0,5 мл с помощью стерильного физиологического раствора, тогда как к менструальному осадку добавлялось 0,2 мл этого же раствора. Все образцы были тщательно перемешаны с использованием пульс-вortexирования. 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 этапе, согласно рекомендациям производителей реагентов, ДНК была выделена также и из образцов отрицательного контроля.

Микробиологические профили были проанализированы с использованием следующих промышленных 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 & 2, Cytomegalovirus. Помимо этого, были измерены уровни человеческой ДНК для контроля качества сбора биоматериала ($>10^3$ копий на реакциюную 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 реакционную смесь. Результаты количественного анализа нормализовались по уровню общей бактериальной массы и представлялись в виде параметра «обсемененность», выраженного в процентах. Для удобства расчетов уровни микроорганизмов *Candida spp.* нормализовались по этому же параметру. Ввиду ограничений примененной микробиологической панели для ПЦР-РВ некоторые близкородственные таксоны бактерий анализировались коллективно. В таких случаях при отображении результатов анализа названия таксонов соединены символом «+».

Отсутствие контаминации аналитической системы было обеспечено тестированием представленных производителем образцов отрицательного контроля в дополнение к вышеуказанным образцам отрицательного контроля на этапе выделения ДНК.

2.4 Анализ иммунных медиаторов

После размораживания менструальный супернатант доводился стерильным физиологическим раствором до объема 0,4 мл при необходимости, а затем разбавлялся 1:1 тем же раствором. Анализ иммунных медиаторов 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: фактор роста фибробластов (англ. – Fibroblast growth factor basic, FGF); Eotaxin, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (англ. – Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (англ. – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, 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; рост-регулирующий онкоген (англ. – Growth regulated oncogene α , GRO- α); фактор роста гепатоцитов (англ. – Hepatocyte growth factor, HGF); LIF; MCP-1; MCP-3; IP-10; монокин, индуцируемый IFN- γ (англ. – Monokine induced by IFN- γ , MIG); фактор роста нервов β (англ. – β Nerve growth factor, NGF- β); фактор стволовых клеток (англ. – Stem cell factor, SCF); фактор роста стволовых клеток β (англ. – Stem cell growth factor β , SCGF- β); стромальный клеточный фактор (англ. – Stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α); макрофагальный воспалительный белок (англ. – Macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α); MIP-1 β ; тромбоцитарный фактор роста (англ. – Platelet-derived growth factor, PDGF-BB); хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (англ. – Regulated upon Activation Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted, RANTES); TNF- α ; TNF- β ; VEGF; Т-клетки аттрактирующий хемокин (англ. – Cutaneous T cell-attracting chemokine, CTACK); апоптоз-индуцирующий лиганд, связанный с TNF (англ. – TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL). Каждый образец анализировался в дубликатах. Аналитические характеристики примененной технологии представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Аналитические характеристики примененной технологии мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на магнитных частицах

Иммунные медиаторы	Рабочий диапазон измерений, пг/мл	Предел обнаружения, пг/мл
CTACK	2,10-15656,00	0,82
Eotaxin	0,14-2281,00	0,05
Basic FGF	3,26-3341,00	2,54
G-CSF	6,35-104106,00	3,63
GM-CSF	0,48-7846,00	0,19
GRO- α	21,05-31255,00	13,45
HGF	8,76-143513,00	7,09

Продолжение Таблицы 3

Иммунные медиаторы	Рабочий диапазон измерений, пг/мл	Предел обнаружения, пг/мл
IFN- α 2	0,95-15569,00	0,46
IFN- γ	1,57-25665,00	1,05
IL-1 α	3,73-61154,00	6,65
IL-1 β	0,29-4672,00	0,24
IL-1ra	6,21-34949,00	3,16
IL-2	1,29-21178,00	0,75
IL-2R α	1,48-24270,00	1,65
IL-3	0,13-2139,00	0,13
IL-4	0,19-3064,00	0,09
IL-5	3,63-59499,00	0,86
IL-6	0,38-6244,00	0,34
IL-7	1,92-31475,00	1,22
IL-8	0,85-13992,00	0,36
IL-9	3,62-31527,00	1,08
IL-10	1,06-17427,00	0,69
IL-12 (p70)	14,68-240582,00	6,39
IL-12 (p40)	1,43-23425,00	0,78
IL-13	0,31-5157,00	0,22
IL-15	12,42-203426,00	12,82
IL-16	1,20-19639,00	0,25
IL-17	2,44-39972,00	1,16
IL-18	0,66-10892,00	0,31
IP-10	3,41-34953,00	1,43
LIF	3,86-53806,00	2,05
MCP-1	0,53-8755,00	0,44
MCP-3	0,48-4899,00	0,24

Продолжение Таблицы 3

Иммунные медиаторы	Рабочий диапазон измерений, пг/мл	Предел обнаружения, пг/мл
M-CSF	0,75-12290,00	0,27
MIF	2,70-44168,00	2,45
MIG	3,19-32365,00	1,39
MIP-1 α	0,12-1218,00	0,06
MIP-1 β	1,41-1439,00	1,41
β -NGF	0,47-7655,00	0,23
PDGF-BB	7,12-37133,00	2,96
RANTES	16,72-26467,00	3,98
SCF	1,82-29899,00	0,99
SCGF- β	82,11-1345200,00	141,77
SDF-1 α	7,54-9381,00	2,44
TNF- α	3,33-54566,00	1,13
TNF- β	0,80-13186,00	0,38
TRAIL	1,78-29188,00	0,89
VEGF	18,01-149830,00	10,16

Из-за высокой степени вариабельности процедуры забора менструальной крови (различающиеся объемы стерильного физиологического раствора, который мог остаться в катетере, неизвестное соотношение крови к эндометриальному секрету и др.) уровни всех анализируемых иммунных факторов нормализовались по общему белку и представлялись как пг анализа 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, тогда как известно, что гемоглобин может интерферировать с сигналом флуорофоров, используемых при иммунофлуоресцентном анализе. Таким образом,

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.

2.5 Статистический анализ

Статистический анализ был осуществлен в компьютерной программе 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 зависимых качественных данных в нескольких группах было произведено с использованием Q-критерия Кохрена. Зависимые количественные данные в нескольких группах были сравнены с использованием критерия Фридмана, а в случаях, когда качественные данные были доступны только для двух групп, использовался ранговый критерий Вилкоксона. U-критерий Манна-Уитни был использован для сравнения независимых количественных данных, а точный критерий Фишера – для качественных переменных. В связи с низкой встречаемостью большинства таксонов, количественный анализ микробиоты различных отделов репродуктивного тракта в этапе 1 исследования был осуществлен только для образцов, положительных по анализируемому микроорганизму. Исключение отрицательных образцов помогло избежать дубликации результатов качественного анализа и определило позицию таксонов в структуре популяции. 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 Шеннона был произведен для характеристики разнообразия популяций микроорганизмов (важно упомянуть, что, вследствие ограничений выбранной микробиологической панели ПЦР-РВ в настоящем исследовании индекс Шеннона отражает только

разнообразие популяции вагиноз-ассоциированной микробиоты и не должен напрямую сравниваться с другими данными альфа-разнообразия, полученными при изучении данных 16S рРНК секвенирования). Нулевая гипотеза отвергалась при значении $p < 0,05$. Из-за поискового дизайна исследования, а также из-за того, что многие количественные переменные были зависимыми, применение каких-либо поправок на множественные сравнения является неоднозначным и может привести к существенному увеличению частоты ошибок II типа (особенно учитывая большое количество одновременно анализируемых параметров) [20, 102]. Тем не менее было принято решение представлять данные в двух форматах (как с поправкой, так и без). Для сохранения удобства визуального восприятия данных изменялись не сами p -значения, а применялся контроль частоты ложного выявления (установленный на уровне 0,2) по методу Бенджамини-Хохберга, который подразумевает расчет индивидуального порога для каждого полученного p -значения при множественных сравнениях. Таким образом, далее p -значения (или соответствующие переменные), не потерявшие статистическую значимость после поправки Бенджамини-Хохберга, помечались символом «*». При анализе корреляционных взаимодействий поправка на множественные сравнения не применялась, так как в данном случае в первую очередь интерпретировалась величина самого коэффициента корреляции.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

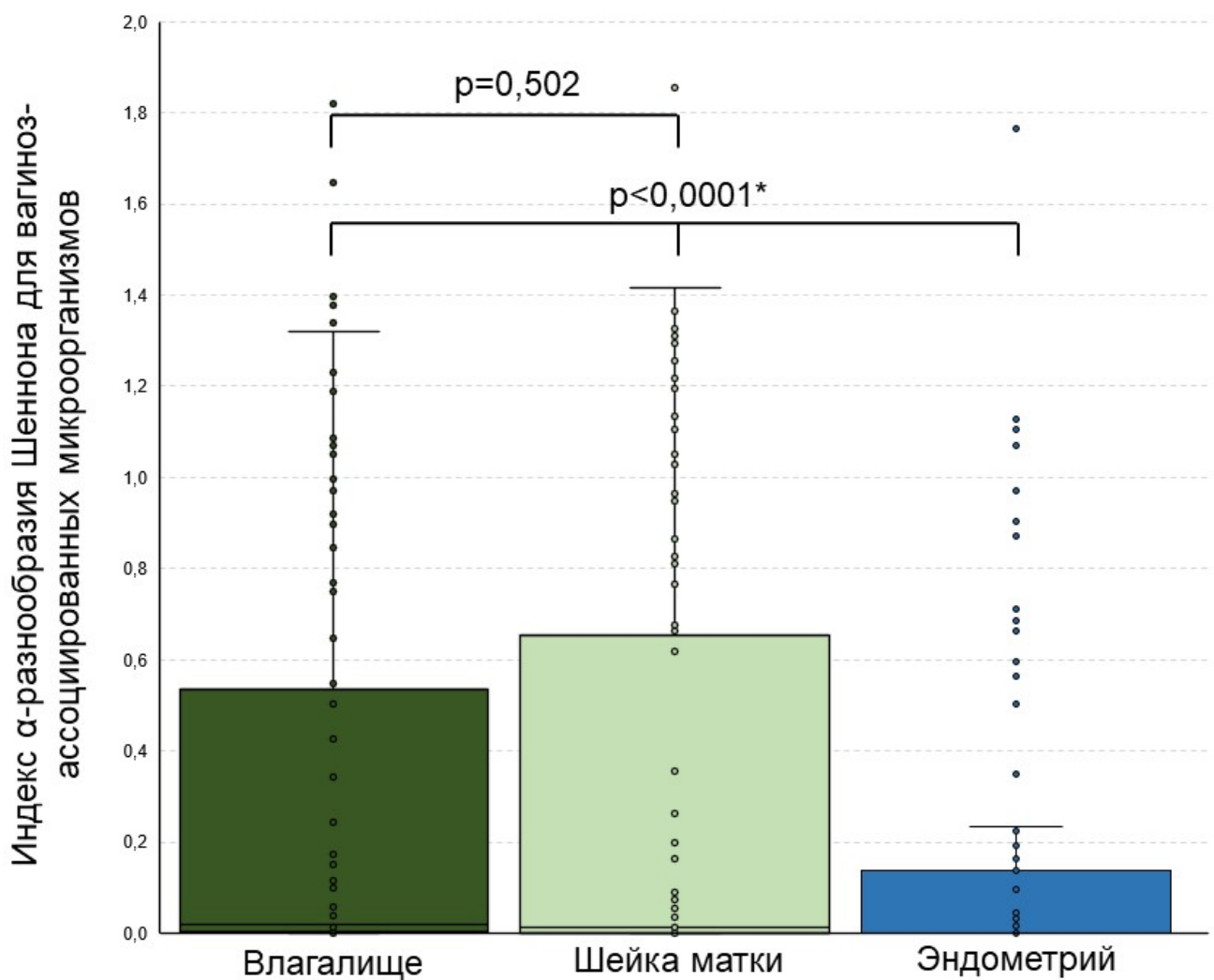
3.1 Этап 1 исследования

Все проанализированные образцы прошли контроль качества взятия биоматериала и содержали человеческую ДНК (за исключением одного цервикального образца, который был впоследствии исключен из анализа). Образцы отрицательного контроля (включая те, что были получены на этапе выделения ДНК) не продемонстрировали контаминацию человеческой, бактериальной, грибковой или вирусной ДНК (по крайней мере в отношении таксонов, входящих в используемую панель ПЦР-PB). Общая бактериальная нагрузка, выраженная в копиях бактериальных геномов на реакционную смесь, статистически значимо различалась в образцах эндометрия, шейки матки и влагалища. Наибольшей она была во влагалище, затем в шейке матки, затем в эндометрии ($7,9 \times 10^7$ ($2,5 \times 10^7$; $2,5 \times 10^8$) 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), что лишь подтверждало необходимость нормализации уровней ДНК исследуемых таксонов по общей бактериальной нагрузке и представления данных в виде «обсемененности», выраженной в процентах.

В то время как все влагалищные и цервикальные образцы были положительны по бактериальной ДНК, она отсутствовала в 16% образцов эндометрия. Важно упомянуть, что несмотря на то, что в этих образцах был выявлен незначительно более низкий уровень человеческой ДНК в сравнении с другими образцами эндометрия ($1,8 \times 10^4$ ($3,5 \times 10^3$; $2,4 \times 10^5$) против $1,6 \times 10^5$ ($2,1 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$) копий в реакционной смеси, соответственно, $p = 0,03$), статистически значимых ассоциаций между концентрацией человеческой ДНК и фактом выявления бактериальной ДНК установлено не было ($p = 0,128$). Также следует отметить, что в данных образцах имела место амплификация бактериальной ДНК, однако ее пороговый цикл не достиг заданного уровня для признания образца положительным. Таким образом, данные образцы следует трактовать не как

обладающие истинной стерильностью, а как образцы с крайне низким содержанием бактериального генетического материала.

Анализ разнообразия микробных популяций установил, что индексы Шеннона были сравнимы по количественным значениям 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 Шеннона для эндометрия значительно отличался от двух вышеприведенных величин (0 (0; $1,4 \times 10^{-1}$), $p<0,0001^*$) (Рисунок 2).



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

Рисунок 2 – Сравнение α-разнообразия микробиоты влагалища, шейки матки и эндометрия

Результаты микробного и вирусного анализов каждого отдельного образца отображены на тепловой карте (Рисунок 3). Сравнительный микробиологический анализ трех исследуемых отделов женского репродуктивного тракта был разделен на две части: качественную и количественную.



В – влагалище; Ц – цервикальный канал (шейка матки); Э – эндометрий. Шкала тепловой карты была сегментирована, чтобы добиться явного цветового разделения между ячейками с выявленными и невыявленными микроорганизмами и вирусами.

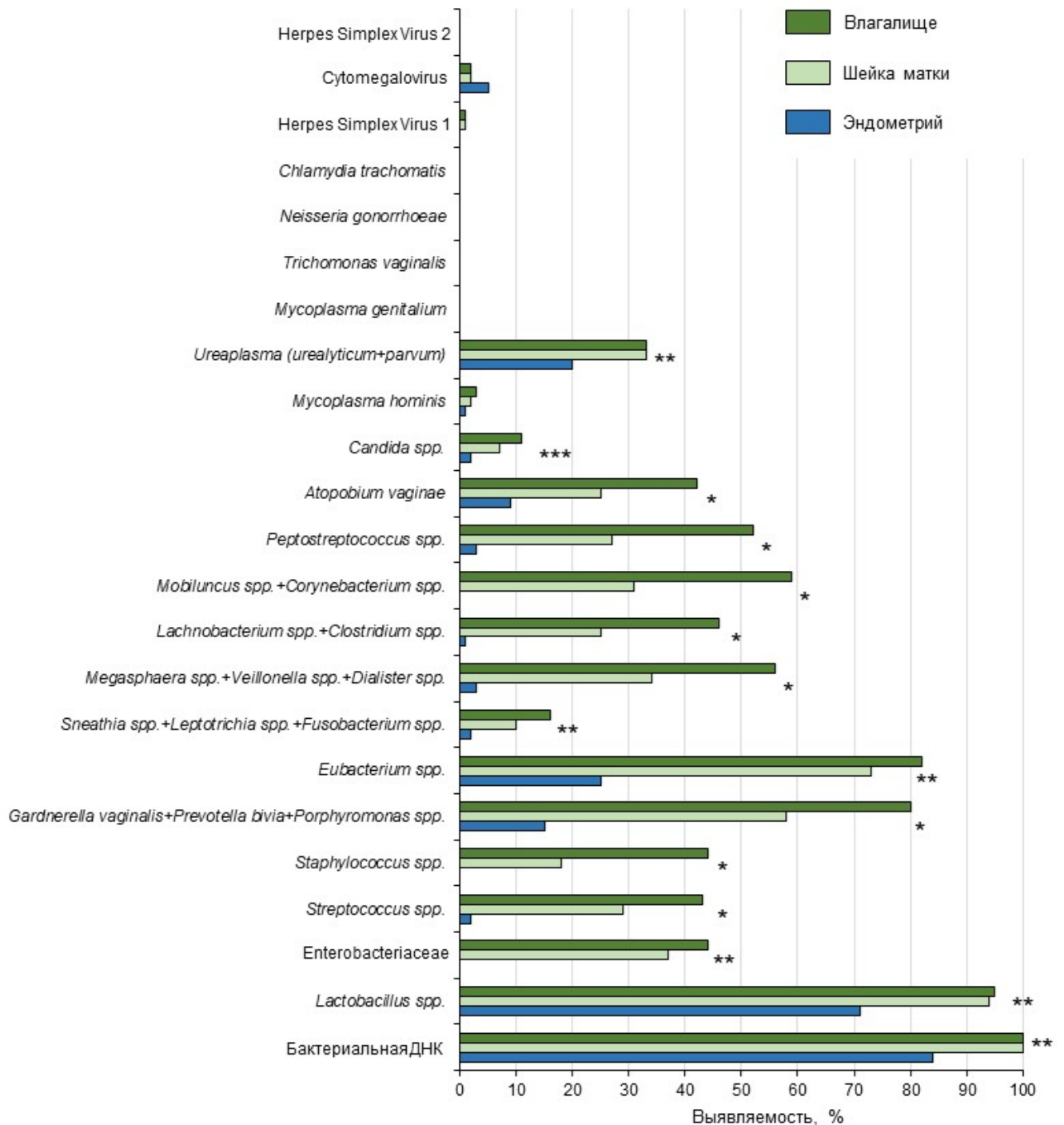
Рисунок 3 – Тепловая карта анализа микробиоты и вирусов на этапе 1 исследования

Сравнение частоты выявления каждой проанализированной группы микроорганизмов или отдельного вида микроорганизмов и вирусов представлено на Рисунке 4. Такие патогенные агенты, как *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas*

vaginalis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, и Herpes Simplex Virus 2, отсутствовали во всех исследуемых образцах. Среди микроорганизмов и вирусов (17 таксонов), выявленных как минимум один раз, результаты образцов влагалища и шейки матки были статистически значимо схожи для 8 таксонов ($p < 0,05^*$). В то же время микробиологический профиль эндометрия отличался от нижележащих отделов женского полового тракта, демонстрируя более низкую частоту выявления 14/17 таксонов ($p < 0,05^*$), за исключением *Candida* spp., в случае которого значимые отличия имелись 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 той же пациентки, представляется особенно интересным. Суммарно было 6 случаев, подходящих под данное описание: Cytomegalovirus – 3 пациентки; *Candida* spp. – 1 пациентка; Cytomegalovirus + *Candida* spp. – 1 пациентка, *Atopobium vaginae* – 1 пациентка. Гистопатологическое исследование Cytomegalovirus-позитивных образцов не выявило характерных для поражения этим вирусом изменений клеток.

Количественное сравнение не выявило значимых различий между составом микроорганизмов в шейке матки и влагалище для микроорганизмов, которые были выявлены в обоих отделах (Приложение Б Таблица 1). С другой стороны, количественный анализ микробиоты эндометрия значимо отличался от микробиоты влагалища по 3 из 16 проанализированных таксонов и от микробиоты шейки матки по 2 из 16 ($p < 0,05$). Таким образом, в случаях, когда микроорганизм одновременно определялся во всех трех отделах, его встречаемость была относительно одинаковой, что подтверждает баланс микробиологического континуума репродуктивного тракта. Среди всех исследованных таксонов только обсемененность группой *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas*

spp. была ассоциирована (негативно) с таковой *Lactobacillus* spp. в эндометрии ($p=0,039$).



* – 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.

Рисунок 4 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов на этапе 1 исследования

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 (ОШ) 19,3; доверительный интервал: 1,6–243,7; $p=0,02^*$), однако уровень выявляемости данной группы был довольно низок (3%), поэтому необходимо интерпретировать данные результаты с осторожностью.

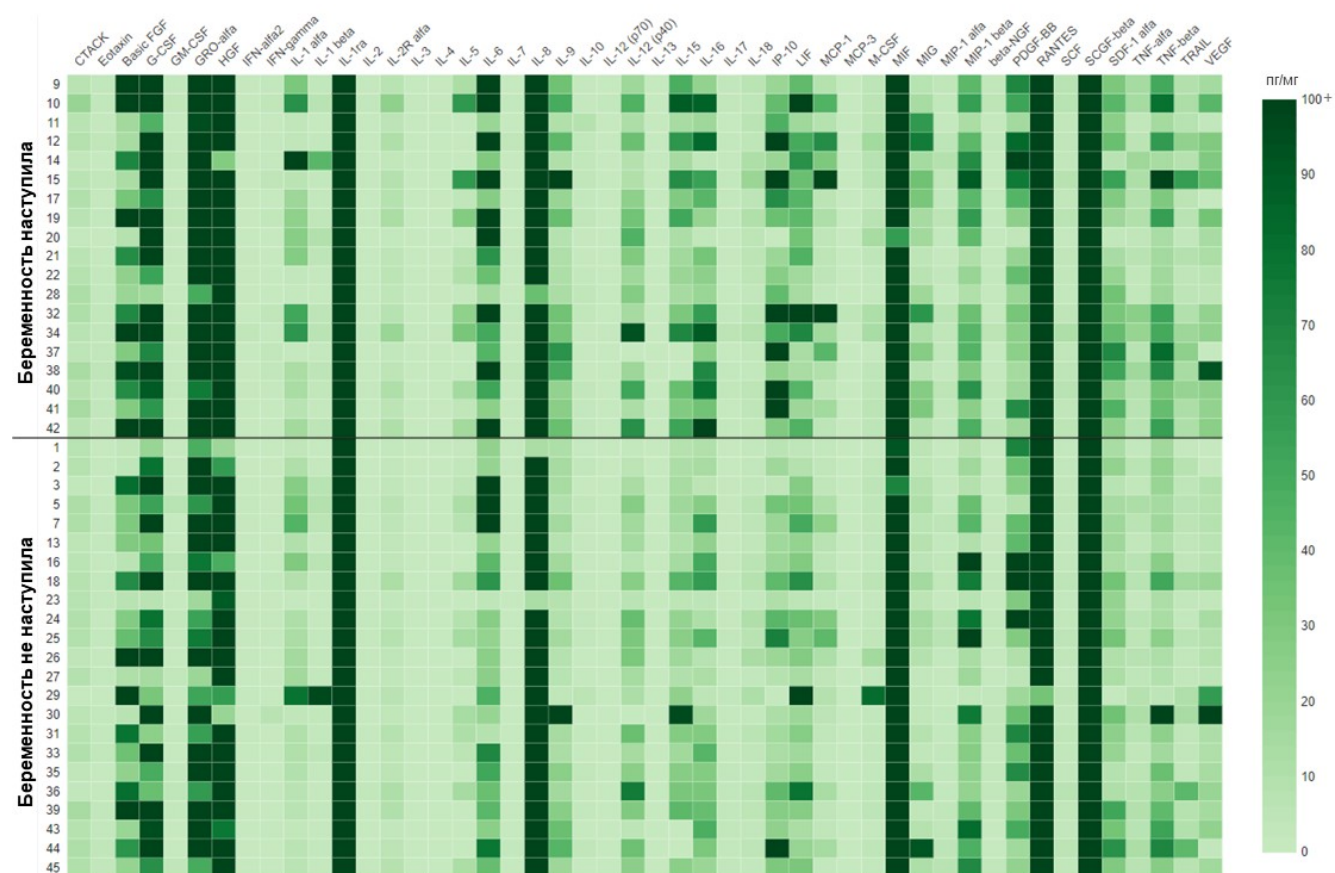
3.2 Этап 2 исследования

3.2.1 Цитокиновое профилирование менструальной крови

Все 48 иммунных медиаторов, входящих в заявленную аналитическую панель, оказались детектируемы в менструальном супернатанте. Случаи, когда в заданном образце биоматериала уровень того или иного цитокина был ниже порога обнаружения, были крайне редки (87 из 2016 индивидуальных анализов). Результаты анализа всей панели цитокинов в каждом образце биоматериала визуализированы на тепловой карте (Рисунок 5).

Подробная информация о результатах анализа уровней каждого цитокина в общей выборке, а также о результатах сравнения групп «беременность наступила» и «беременность не наступила» представлена в Приложении В Таблице 1. Среди проанализированных иммунных медиаторов статистически значимая разница между группами «беременность наступила» и «беременность не наступила» была обнаружена для G-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, MCP-1, M-CSF*, SDF-1 α , TNF- β , TRAIL*, SCF*, IP-10* и MIG* ($p<0,05$) (Приложение Г Рисунки 1-12). 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) (Рисунок 6). При пороговом значении 17,99 пг/мг IP-10 позволял предсказывать успешный исход крио-ПЭ с чувствительностью 95% и специфичностью 57%. Другими словами, пациентки с

уровнями IP-10 в менструальном супернатанте ниже вышеобозначенного порога имели шансы забеременеть в результате крио-ПЭ 5%. Впрочем, данные результаты необходимо подтвердить на расширенной выборке пациенток.



Для шкалы тепловой карты был установлен порог в 100 пг/мг аналита, чтобы обеспечить цветовое разделение в области низких концентраций.

Рисунок 5 – Тепловая карта для цитокинового профилирования менструальной крови

Благодаря тому, что профилирование менструального супернатанта было выполнено с использованием столь широкой панели иммунных медиаторов, стало возможным подробное изучение взаимодействий между всеми анализируемыми цитокинами, хемокинами и факторами роста. Визуализация данного взаимодействия была выполнена с помощью матрицы корреляции (Рисунок 7). Было установлено, что концентрации всех 12 иммунных медиаторов, уровни которых были повышены у пациенток из группы «беременность наступила», по

большей части значимо коррелировали между собой. Согласно шкале Чеддока корреляция была положительной с силой эффекта от слабой до высокой (r_s варьировал от 0,31 до 0,77 для статистически значимых корреляций при $p < 0,05$).

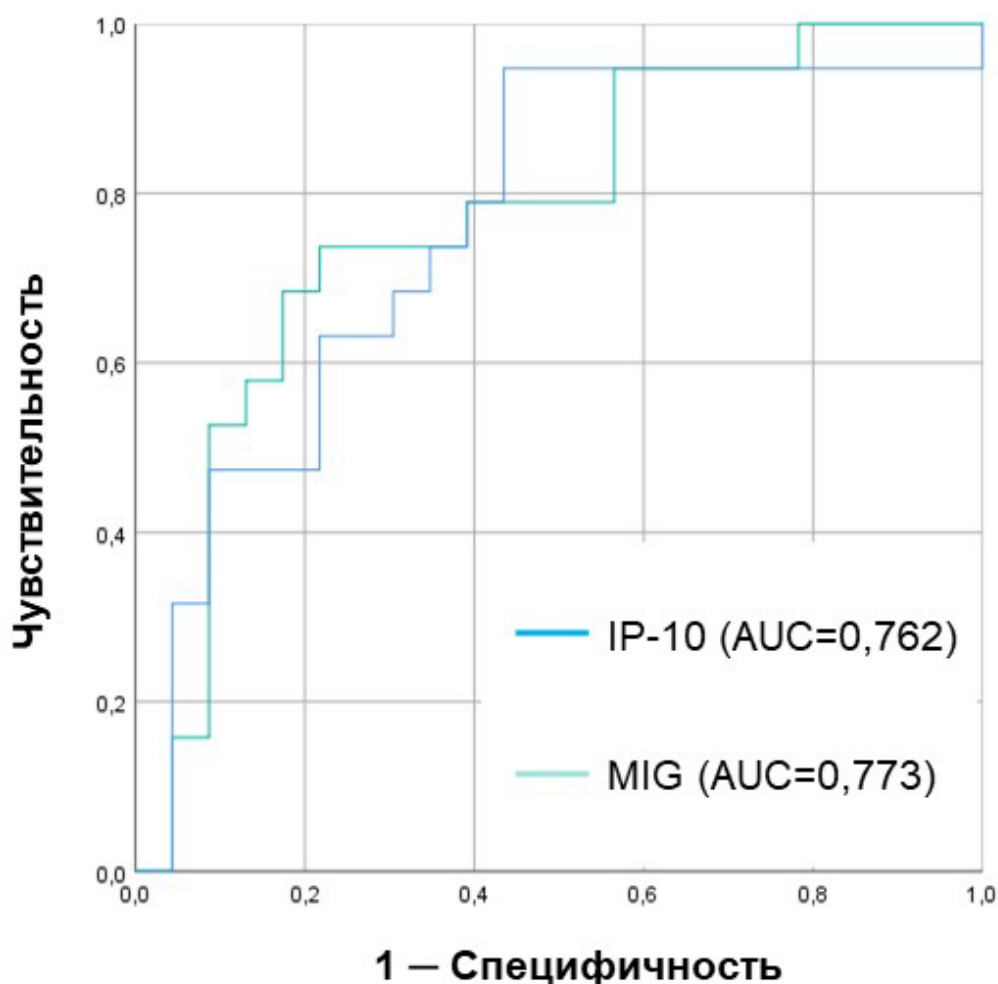
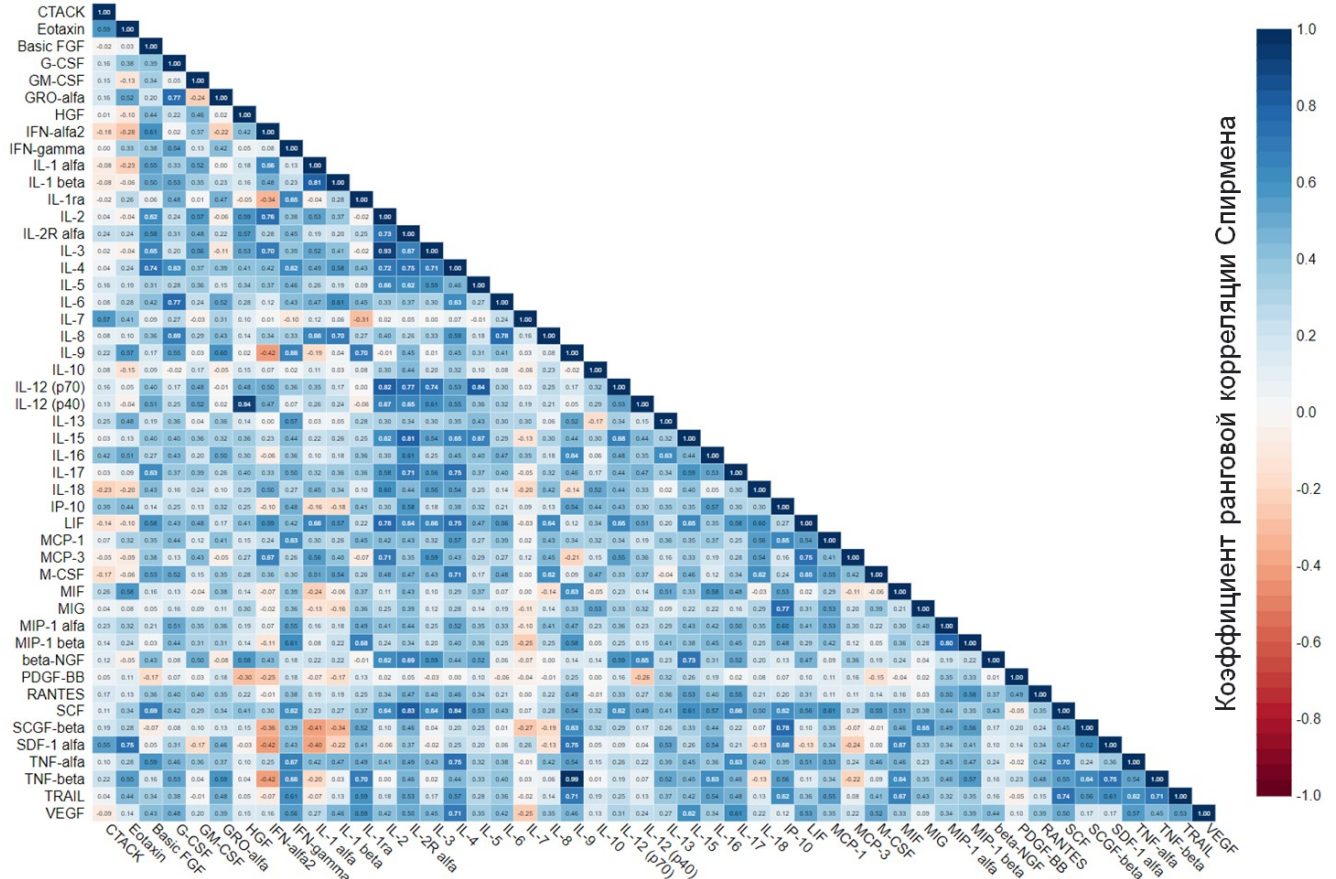


Рисунок 6 – ROC-кривая оценки РЭ для уровней IP-10 и MIG в менструальном супернатанте

Среди релевантных клинических параметров лишь эндометриоз и СОР были достаточно распространены в исследуемой когорте пациенток, чтобы выделять соответствующие подгруппы и проводить сравнения уровней сигнальных молекул. 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) (Рисунок 8). 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) (Рисунок 9).

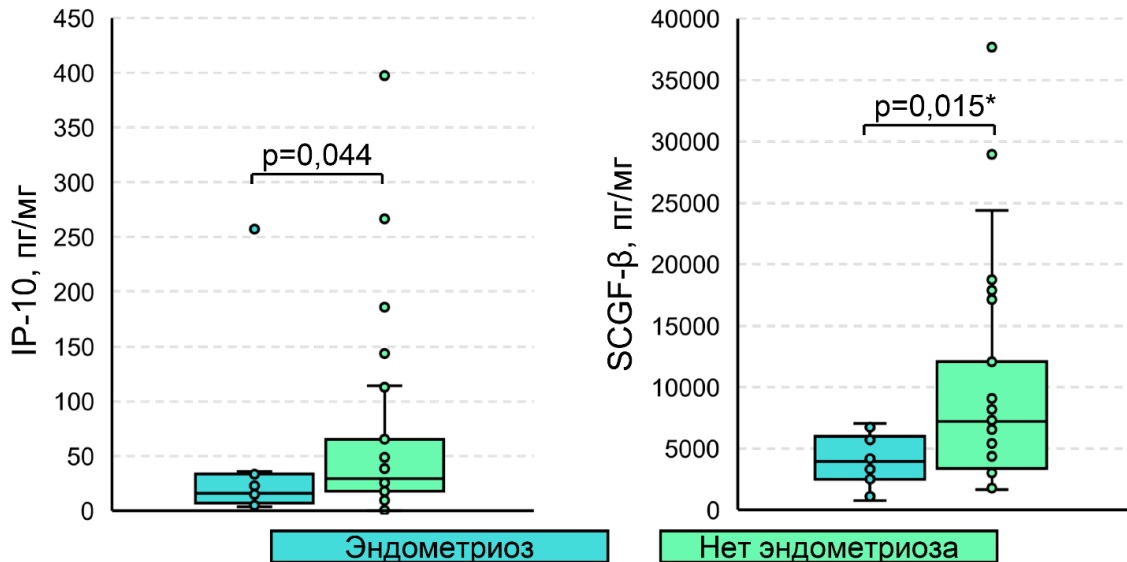


Данные из общей когорты пациенток.

Рисунок 7 – Матрица корреляции для уровней 48 иммунных медиаторов в менструальном супернатанте

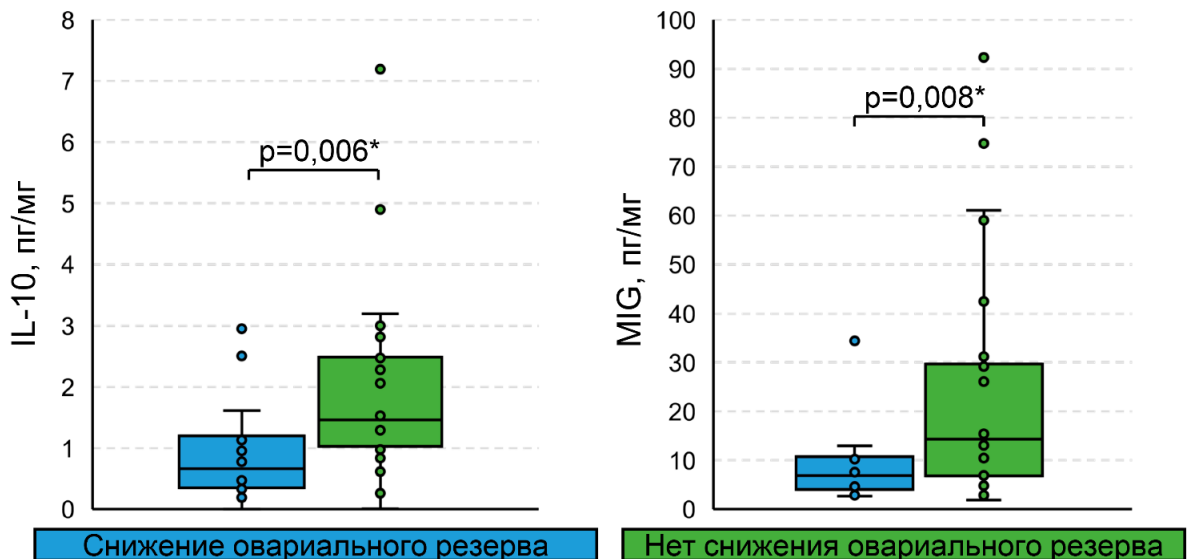
Присутствие гемолиза в образцах менструальной крови оказало довольно малое влияние на измерения уровней цитокинов. Статистически значимая корреляция ($p<0,05$) с уровнем гемоглобина была обнаружена только для Eotaxin, GM-CSF, IL-4, IL-9, IL-10, IL-18, MIP-1 β , β -NGF, SCF, SDF-1 α , TNF- β (положительная, слабый эффект: r_s варьировал от 0,31 до 0,45) и для CTACK, 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 поиска корреляции. Подробные результаты анализа корреляции уровней гемоглобина и всех проанализированных иммунных медиаторов в менструальном супернатанте представлены в Таблице 4.



Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок 8 – Сравнение уровней IP-10 и SCGF-β у пациенток с эндометриозом и без данного диагноза



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

Рисунок 9 – Сравнение уровней IL-10 и MIG у пациенток со сниженным и несниженным овариальными резервами

Таблица 4 – Результаты анализа корреляции уровней гемоглобина и 48 проанализированных иммунных медиаторов в менструальном супернатанте

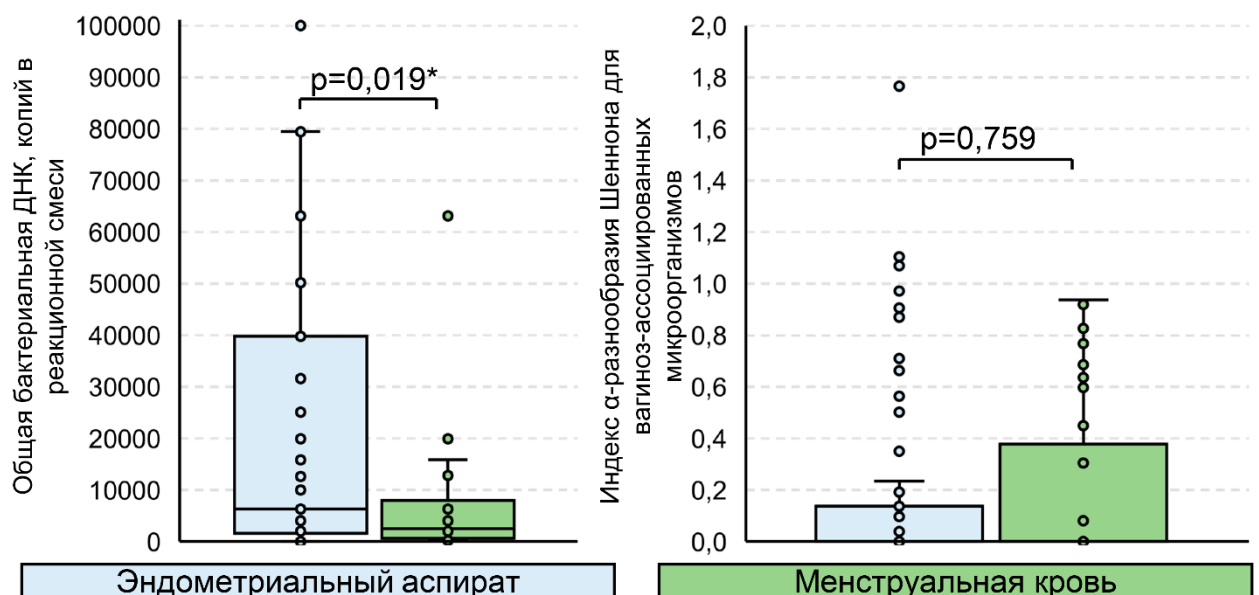
Иммунные медиаторы	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для гемоглобина	p-значение
CTACK	0,533	0,001
Eotaxin	0,378	0,014
Basic FGF	0,181	0,252
G-CSF	0,045	0,775
GM-CSF	0,311	0,045
GRO- α	0,005	0,975
HGF	0,271	0,082
IFN- α 2	0,169	0,284
IFN- γ	минус 0,029	0,854
IL-1 α	0,258	0,099
IL-1 β	0,262	0,094
IL-1ra	0,281	0,071
IL-2	0,273	0,080
IL-2R α	0,226	0,150
IL-3	0,259	0,098
IL-4	0,323	0,037
IL-5	минус 0,040	0,803
IL-6	минус 0,048	0,761
IL-7	0,286	0,066
IL-8	0,126	0,427
IL-9	0,429	0,005
IL-10	0,340	0,027
IL-12 (p70)	0,187	0,235
IL-12 (p40)	0,297	0,056
IL-13	0,218	0,166

Продолжение Таблицы 4

Иммунные медиаторы	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена с гемоглобином	p-значение
IL-15	0,244	0,120
IL-16	0,170	0,282
IL-17	0,237	0,130
IL-18	0,432	0,004
IP-10	минус 0,103	0,516
LIF	0,133	0,400
MCP-1	минус 0,114	0,473
MCP-3	0,064	0,688
M-CSF	0,234	0,135
MIF	минус 0,006	0,970
MIG	0,126	0,428
MIP-1 α	0,271	0,083
MIP-1 β	0,365	0,017
β -NGF	0,317	0,041
PDGF-BB	0,616	0,001
RANTES	0,651	0,001
SCF	0,333	0,031
SCGF- β	0,243	0,121
SDF-1 α	0,454	0,003
TNF- α	0,153	0,334
TNF- β	0,452	0,003
TRAIL	минус 0,139	0,381
VEGF	0,022	0,888

3.2.2 Микробиологическое профилирование менструальной крови

Все образцы успешно прошли контроль качества взятия биоматериала и продемонстрировали высокое содержание человеческой ДНК ($5,0 \times 10^5$ ($1,6 \times 10^5$; $1,3 \times 10^6$) копий в реакционной смеси). Также не было обнаружено контаминации отрицательных контрольных образцов ни микробным, ни вирусным генетическим материалом. Уровни общей бактериальной ДНК в осадке менструальной крови оказались несколько ниже, чем в эндометриальном аспирате пациенток из первого этапа исследования ($2,3 \times 10^3$ ($0,6 \times 10^3$; $7,9 \times 10^3$) против $6,3 \times 10^3$ ($1,6 \times 10^3$; $4,0 \times 10^4$) копий в реакционной смеси, соответственно, $p=0,019$) (Рисунок 10).

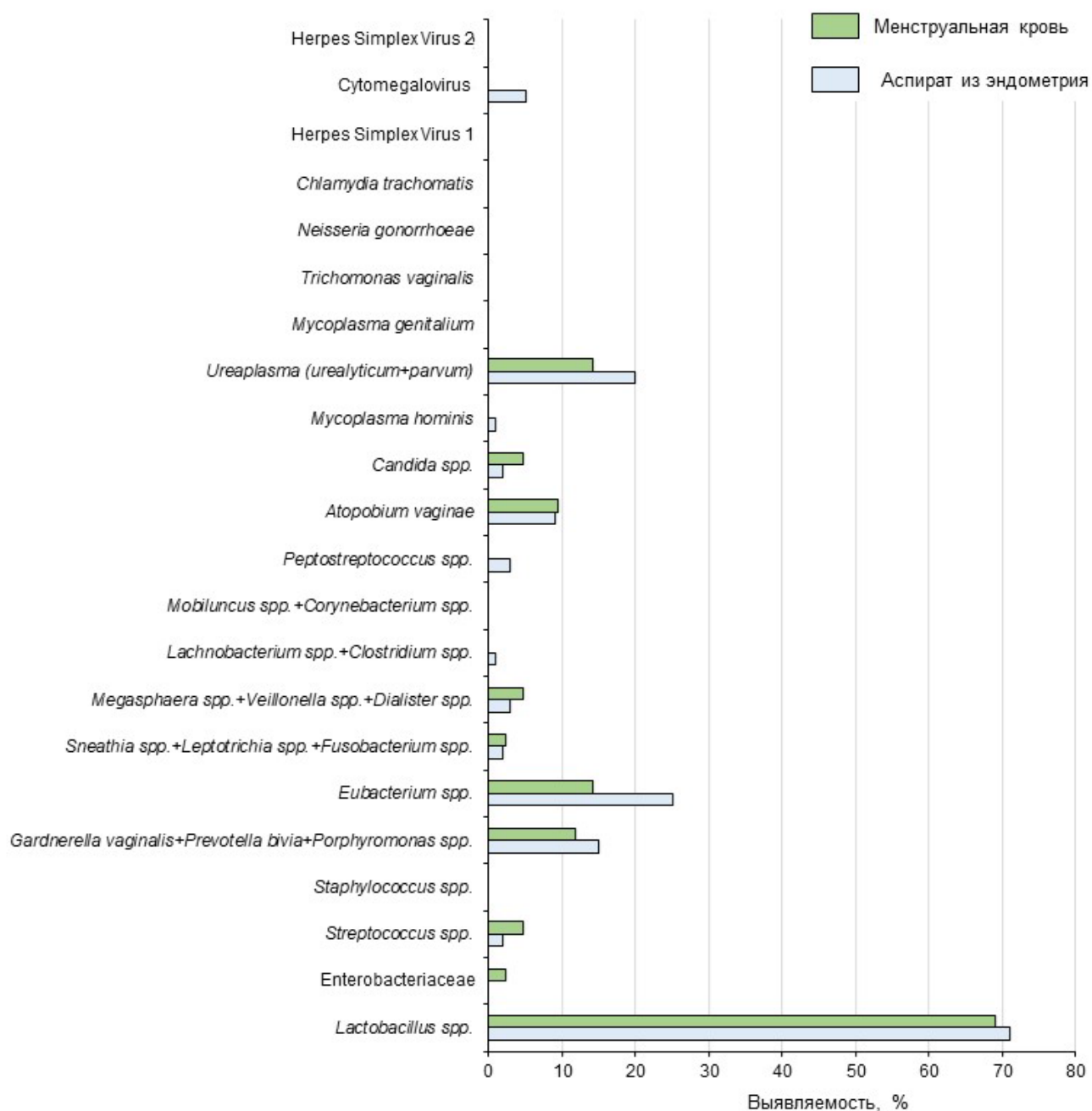


Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок 10 – Сравнение уровней общей бактериальной ДНК и индексов α -разнообразия Шеннона между биоматериалом из эндометрия, собранным на первом и втором этапе исследования

Стоит отметить, что пациентки в двух этапах исследования не совпадали и что методология выделения нуклеиновых кислот также была иной, что необходимо учитывать при интерпретации этих различий в уровнях общей бактериальной ДНК. Корреляции между концентрациями человеческой и бактериальной ДНК в менструальном осадке обнаружено не было ($r_s=0,07$, $p=0,645$). Впрочем, индексы

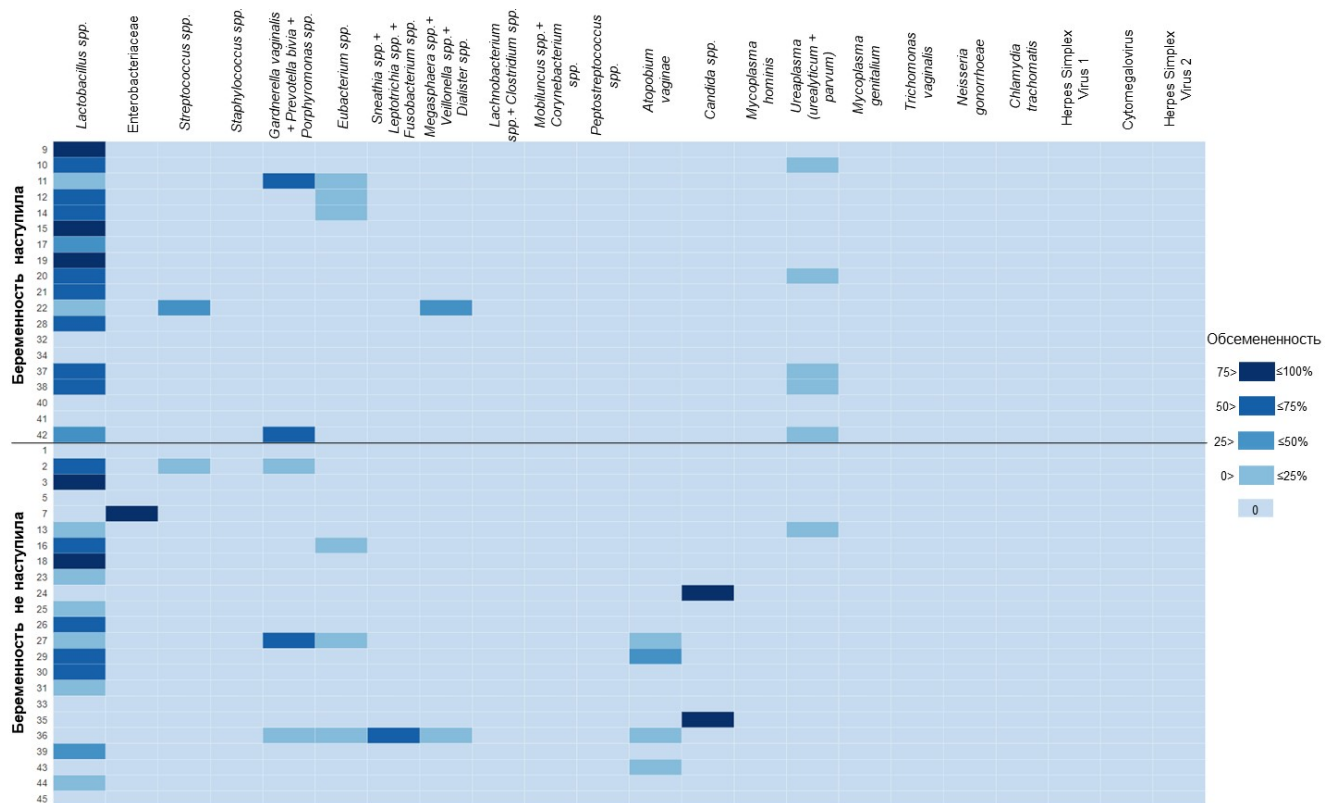
α -разнообразие Шеннона между менструальным осадком и эндометриальным аспирином из этапа 1 значимо не различались и были крайне низкими в обоих случаях (0 (0; 0,34) против 0 (0; 0,14), соответственно, $p=0,759$) (Рисунок 10). Более того, эти виды биоматериала не различались по частоте выявления ни одного из исследуемых таксонов микроорганизмов и вирусов ($p>0,05$) (Рисунок 11).



Статистически значимые различия отсутствовали во всех случаях.

Рисунок 11 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов между аспирином из эндометрия и менструальной кровью

Результаты микробиологического профилирования менструальной крови в группах «беременность наступила» и «беременность не наступила» суммированы на тепловой карте (Рисунок 12). Как и на первом этапе исследования, ни у одной из пациенток не были выявлены такие патогенные агенты, как *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, и Herpes Simplex Virus 2. Однако, в отличие от результатов этапа 1, ни в одном случае не был обнаружен генетический материал Cytomegalovirus, *Mycoplasma hominis*, *Peptostreptococcus* spp. и *Lachnobacterium* spp. + *Clostridium* spp.

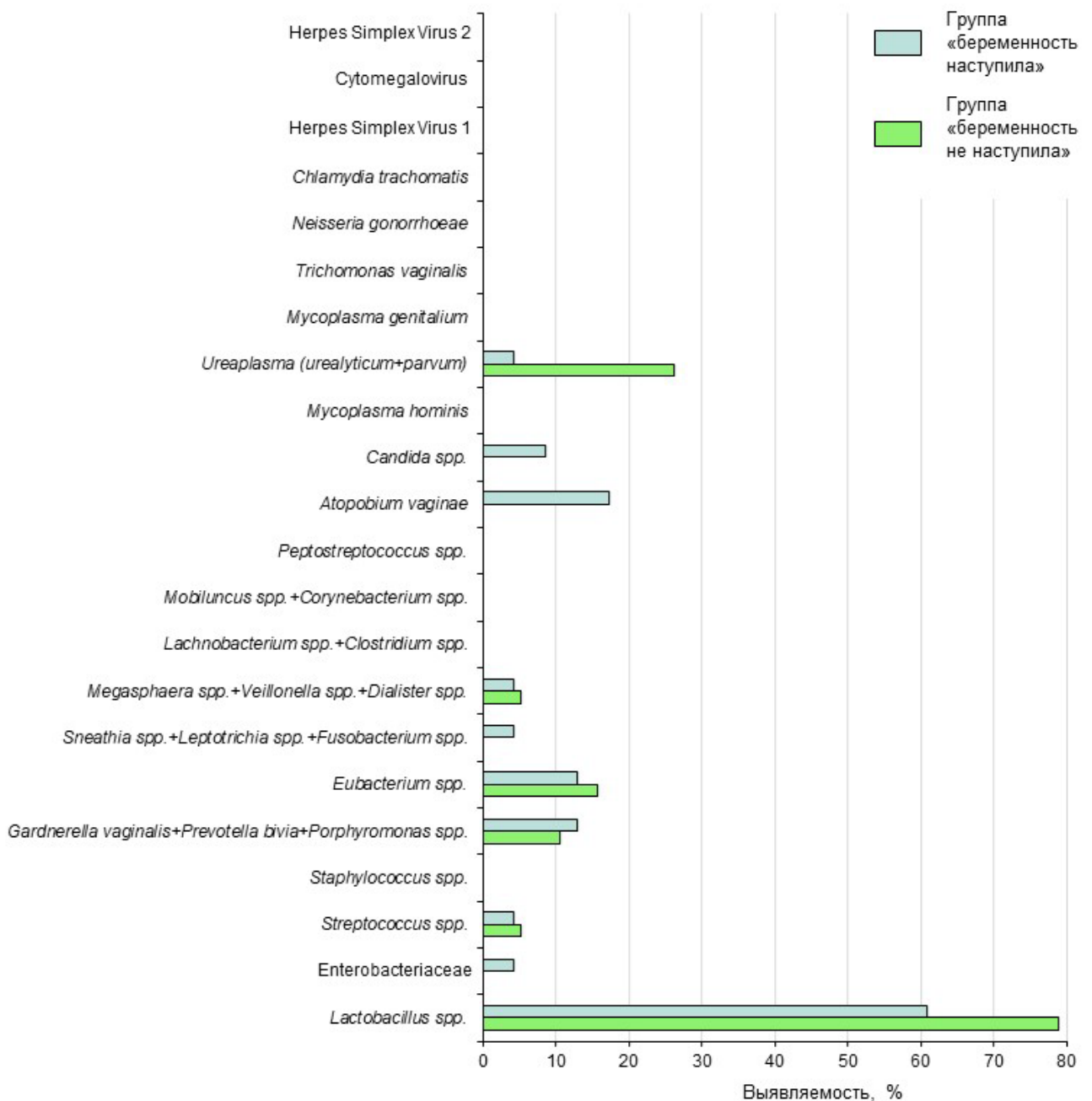


Шкала тепловой карты была сегментирована, чтобы добиться явного цветового разделения между ячейками с выявленными и не выявленными микроорганизмами и вирусами.

Рисунок 12 – Тепловая карта анализа микробиоты и вирусов в менструальной крови

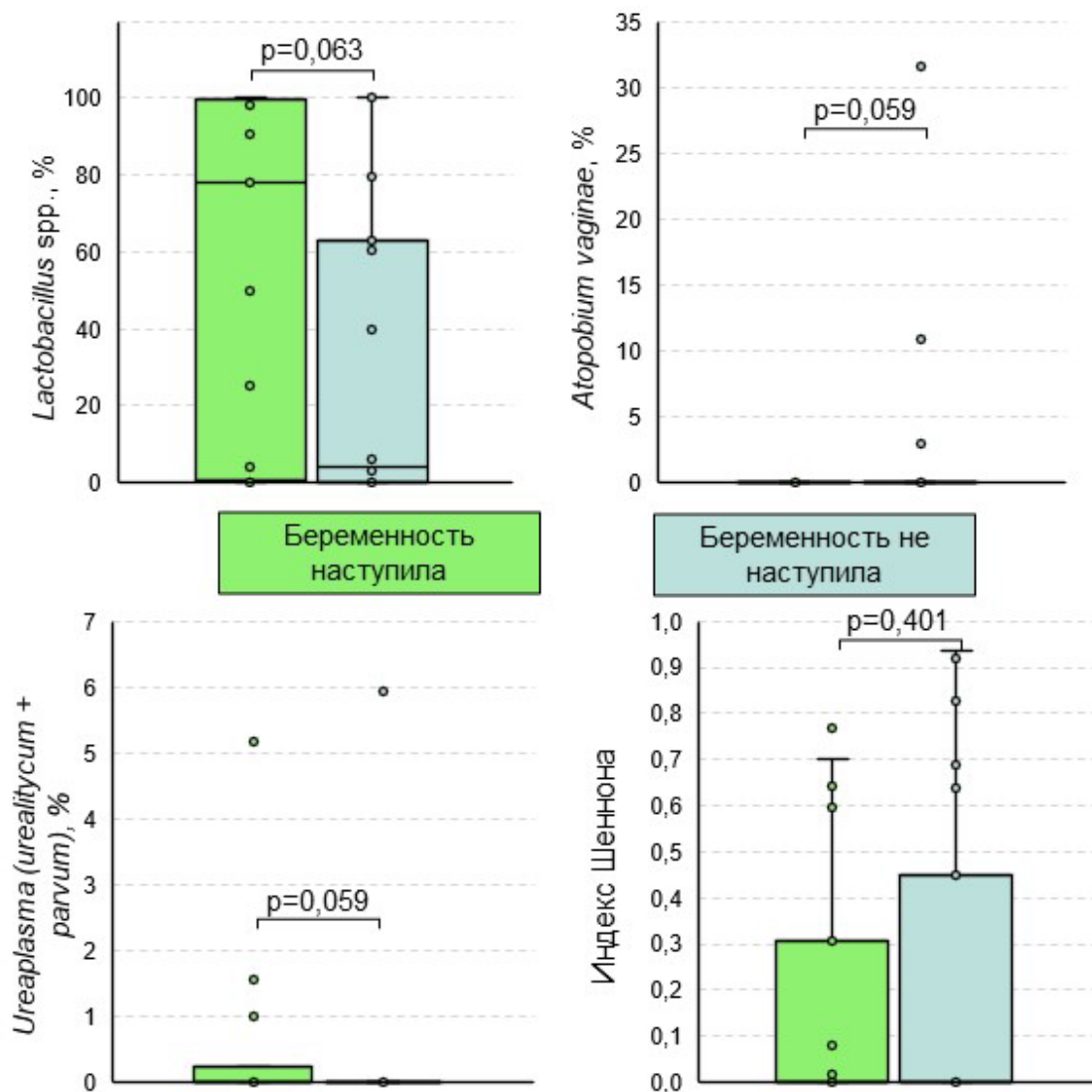
Частота выявления (Рисунок 13) и обсемененность, выраженная в процентах, ни для одного из анализируемых таксонов бактерий, грибов и вирусов не оказались статистически значимо различающимися при сравнении групп «беременность

наступила» и «беременность не наступила», также не было различий у пациенток, разделенных на подгруппы на основании наличия или отсутствия эндометриоза и СОР. На Рисунке 14 представлены диаграммы для таксонов с установленным в ходе сравнения групп пограничным р-значением (от 0,063 до 0,059).



Статистически значимые различия отсутствовали во всех случаях.

Рисунок 13 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов между аспирином из эндометрия и менструальной кровью

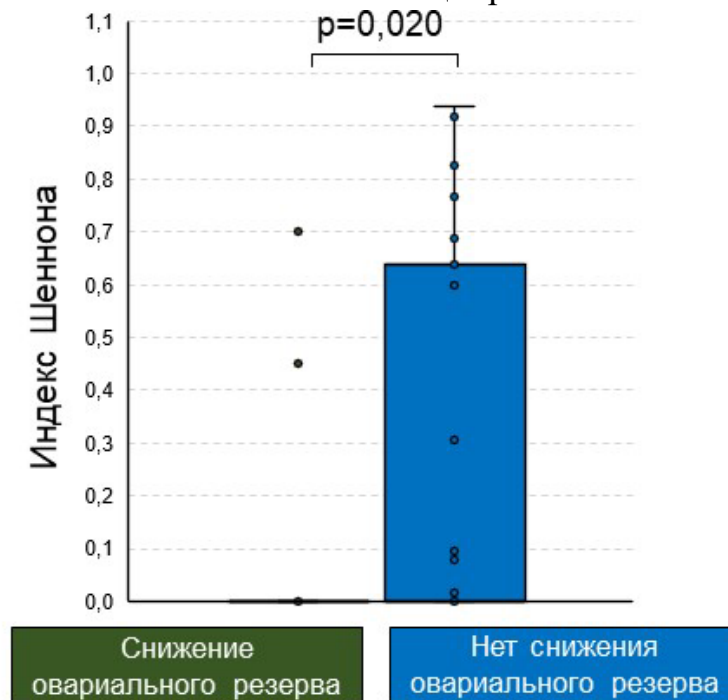


Индексы α -разнообразия Шеннона представлены для вагиноз-ассоциированной микробиоты в рамках использованной микробиологической панели и не отражают истинное α -разнообразие микробиома; показаны микроорганизмы, для которых различия между группами достигли пограничной статистической значимости.

Рисунок 14 – Сравнение обсемененности и индексов α -разнообразия микробиоты Шеннона в группах «беременность наступила» и «беременность не наступила»

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 14). Также по этому параметру не было различий у

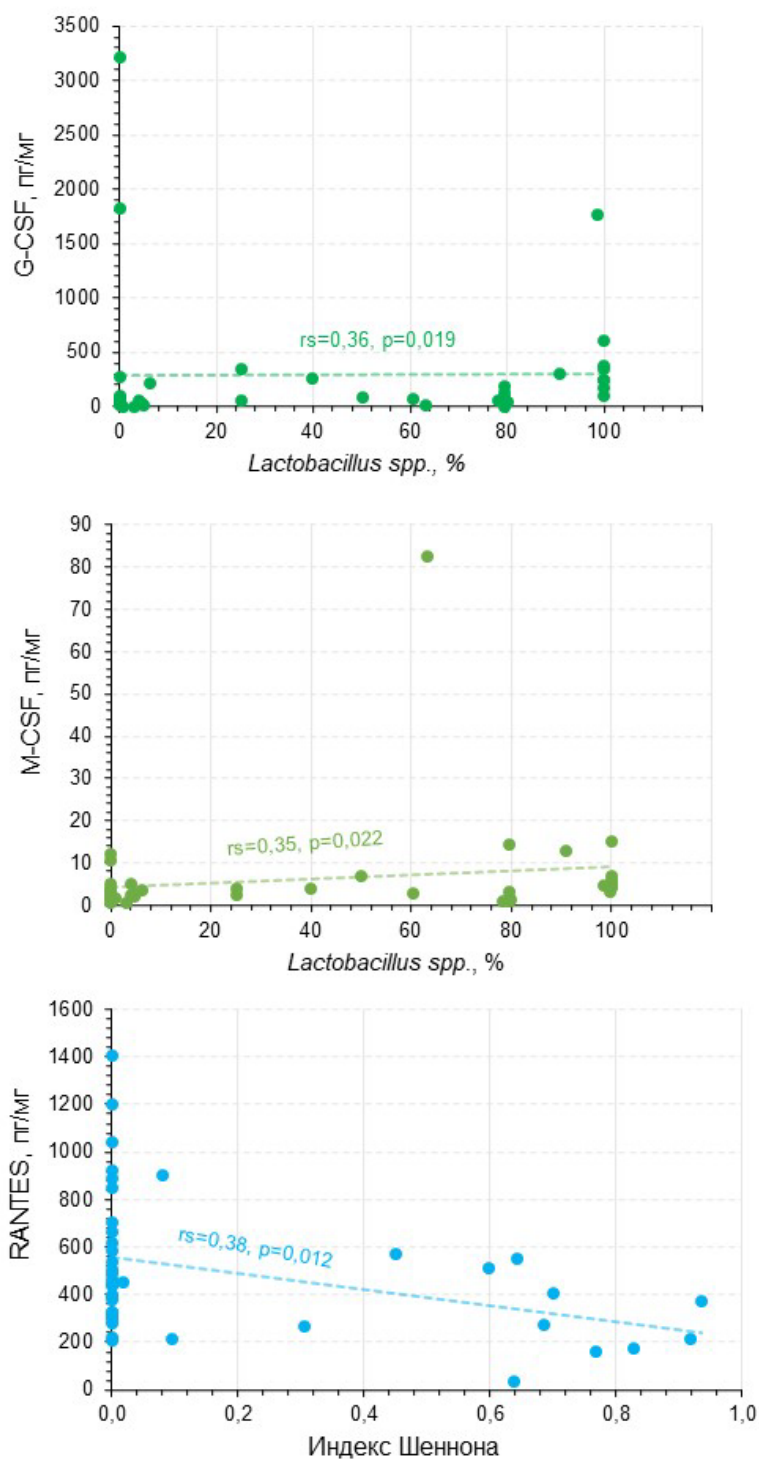
пациенток с наличием и отсутствием эндометриоза ($p>0,05$). Однако индексы Шеннона были слегка понижены у пациенток с СОР (0 [0; 0] против 0,0002 [0; 0,6384], $p=0,02$) (Рисунок 15). Впрочем, стоит отметить, что на этапе 1 индексы Шеннона не оказались значимо ассоциированы с данным состоянием. Более того, при объединении данных из обоих этапов исследования было установлено, что индексы Шеннона не являются значимо ассоциированными с СОР ($p>0,05$).



Индексы α -разнообразия Шеннона представлены для вагиноз-ассоциированной микробиоты в рамках использованной микробиологической панели и не отражают истинное α -разнообразие микробиома.

Рисунок 15 – Сравнение индексов α -разнообразия микробиоты Шеннона у пациенток с наличием и отсутствием снижения овариального резерва

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 ($r_s=0,35$, $p=0,022$), тогда как индексы α -разнообразия Шеннона коррелировали с уровнем RANTES ($r_s=0,38$, $p=0,012$). Во всех случаях корреляция была положительной со слабым эффектом (Рисунок 16).



Индексы α -разнообразия Шеннона представлены для вагиноз-ассоциированной микробиоты в рамках использованной микробиологической панели и не отражают истинное α -разнообразие микробиома.

Рисунок 16 – Зависимости уровней цитокинов и обсемененности микроорганизмами или индексов α -разнообразия Шеннона для значимых корреляций

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Возможность контаминации биоматериала из эндометрия

Несмотря на то, что в последние годы концепция стерильного эндометрия активно подвергается сомнению, до сих пор нет консенсуса в отношении источников микробного генетического материала в полости матки [119, 121, 145]. Основной проблемой является возможность контаминации из нижележащих отделов репродуктивного тракта, так как трансцервикальное получение образцов является единственной возможной опцией для большинства пациенток клиник ВРТ, по крайней мере с этической точки зрения. Любой подход, направленный на снижение риска контаминации цервикальной микробиотой, например, применение дополнительного наружного катетера, предотвращающего контакт с цервикальной слизью основного устройства для взятия пробы (который был использован в настоящем исследовании, на этапе 1), не может гарантировать полную стерильность забора биоматериала. А. Winters и соавт. продемонстрировали, что в образцах биоматериала, взятых в ходе гистерэктомии (то есть при хирургическом доступе к эндометрию, а не трансцервикально), бактериальная ДНК детектировалась лишь в 15 из 25 случаев, тогда как *Lactobacillus* spp. и вовсе присутствовали в 3 из 13 случаев со средней обсемененностью 0,006% [180]. Похожие результаты в отношении низкой выявляемости *Lactobacillus* spp. были получены еще в двух небольших пилотных исследованиях (по 10 участниц в каждом) [118, 175].

С другой стороны, в работе С. Mitchell и соавт. было продемонстрировано, что верхние отделы женского полового тракта, наоборот, в большей степени обсеменены *Lactobacillus iners* (45%) and *Lactobacillus crispatus* (33%) при взятии биоматериала в стерильных условиях и хирургическом доступе [119]. Более того, в исследовании С. Chen и соавт. в когорте пациенток, прошедших оперативное вмешательство в виде лапароскопии или лапаротомии, были выявлены схожие микробиомные профили образцов эндометрия, полученных трансцервикально и

через брюшную полость хирургическим путем, в то время как *Lactobacillus* spp. были доминирующим таксоном (впрочем, их средняя обсемененность составляла 30,6%) [40]. Таким образом, эти противоречивые результаты подчеркивают, что хоть и проблема контаминации может иметь место при трансцервикальном заборе биоматериала, она является не столь критической, как представлялось ранее [22].

Недетектируемая общая бактериальная ДНК в части эндометриальных образцов, а также наличие шести отдельных случаев, где анализируемый агент был обнаружен в эндометрии, но не в нижележащих отделах репродуктивного тракта, могут быть рассмотрены как подтверждение низкой степени контаминации в настоящем исследовании. Важно упомянуть, что готовые *in vitro* коммерческие диагностические ПЦР-РВ наборы, которые были использованы в данной работе, были разработаны для клинических задач. Это означает, что при их разработке закладывалось преобладание специфичности над чувствительностью, что отличает подобные коммерческие тест-системы от подходов, основанных на секвенировании прокариотической 16S рРНК, которые были использованы в большом количестве других исследований эндометриальной микробиоты и имели обратную картину значений чувствительности и специфичности [40, 52, 76, 142]. К примеру, М. Reschini и соавт. отметили, что коммерческий набор ПЦР-РВ для диагностики бактериального вагиноза выявлял *Lactobacillus* spp. только в 53% образцов эндометрия, в то время как анализ при помощи секвенирования нового поколения 16S рРНК выявил представителей этой группы бактерий в 83% образцов [139]. С другой стороны, подробное рассмотрение данных противоречивых случаев (n=15) выявило крайне низкую обсемененность данным микроорганизмом (5 (1-25) %) и, более того, она была значимо ниже, чем в других положительных образцах ($p < 0,05$). Таким образом, метод ПЦР-РВ, использованный в настоящем исследовании, является менее подверженным контаминации, но при этом и менее чувствительным. Отсутствие бактериальной ДНК в части образцов должно быть воспринято соответствующе.

4.2 Микробиологический континуум женского полового тракта

В соответствии с ранее опубликованными данными показано, что эндометрий, в сравнении с влагалищем, имеет значимо отличающийся состав микробиоты [76, 142]. Микробиологический профиль шейки матки более похож на эндометриальный, но все равно он был далек от правильного отображения микробиологического состава полости матки [40]. В любом случае, данные результаты еще рано считать клинически значимыми. Научному сообществу еще предстоит определить роль состава микробиоты полости матки в характеристике РЭ. Значительная методологическая гетерогенность имеющихся на сегодняшний день исследований по данному вопросу не дает возможности сравнить и без того противоречивые результаты, к тому же на данный момент не проведено ни одного актуального мета-анализа. Нет консенсуса ни по встречаемости в матке *Lactobacillus* spp. у пациенток с рецептивным эндометрием [76, 97, 122], ни по увеличенному индексу альфа-разнообразия [52, 61].

В данном исследовании среди проанализированных представителей семейства Herpesviridae только Cytomegalovirus выявлялся в эндометрии (5%), при этом стоит отметить, что в нижележащих отделах репродуктивного тракта он определялся лишь в 1% случаев. В недавнем исследовании S. Blazheva и соавт. был продемонстрирован немного более высокий уровень выявляемости Cytomegalovirus в эндометрии у пациенток с бесплодием (3 из 24) [29]. Считается, что Cytomegalovirus является самым частым этиологическим агентом врожденной инфекции, приводящей к неврологическим осложнениям [174]. Роль Cytomegalovirus, определяемого иммунологически в сыворотке крови или генетическими методами по мазкам из шейки матки, в развитии бесплодия или осложнений у плода до сих пор подвергается спорам, и на данный момент скрининг всех беременных пациенток не входит в клинические рекомендации [55]. Однако взаимосвязь непосредственного эндометриального поражения Cytomegalovirus и инфекции плода еще не изучалась. Наши результаты указывают на возможную необходимость проведения исследований в данной области.

Важно обратить внимание на то, что лишь 2% положительных по *Candida* spp. эндометриальных образцов имели пары положительных результатов в нижележащих отделах репродуктивного тракта (общая выявляемость в шейке матки и влагалище была соответственно 7% и 11%). Данные о патологической роли дрожжей в эндометрии скудны, в основном они ограничены небольшими исследованиями [21, 64, 144]. В недавнем исследовании N. Liu и соавт. показали структурные изменения микобиома шейки матки и влагалища, особенно для некоторых представителей рода *Candida*, у пациенток со спайками в полости матки в сравнении с контрольной группой [111]. Помимо этого, была показана способность *Candida parapsilosis* модулировать воспалительный процесс, фиброз, бактериальную микробиоту в крысиной модели маточных спаек. Полное разобщение результатов выявляемости *Candida* spp. в верхних и нижних отделах репродуктивного тракта в нашем исследовании позволяет выдвигать гипотезу о том, что анализ эндометриального микобиома может быть более информативным, чем его анализ в шейке матки или влагалище при оценке различных гинекологических состояний, вызывающих бесплодие.

4.3 Связь микробиоты эндометрия с клиническими данными

Отсутствие какой-либо значимой связи между характеристиками микробиоты и клиническими параметрами (ХЭ, полипы матки, миома матки, эндометриоз, ИППП в анамнезе) пациенток может быть объяснено низкой встречаемостью исследованных состояний в выборке. Некоторые авторы использовали пороговое значение CD138 клеток – 1 клетка в поле зрения на высоком увеличении для диагностики ХЭ [73]. Использование такого критерия вместо 5 клеток в поле зрения в нашей выборке привело к радикальному изменению встречаемости ХЭ с 11% до 83%, при котором группа *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas* spp. и *Atopobium vaginae* были неожиданно чаще обнаружены в группе пациенток без ХЭ ($p=0,002$ и $p=0,026$, соответственно), что противоречит результатам других исследований [15, 44, 112, 113]. На данный момент отсутствует консенсус по составу микробиоты при ХЭ, в

основном из-за вариаций в критериях диагностики ХЭ во всех опубликованных работах. Как бы то ни было, ХЭ является важным клиническим состоянием, поскольку, как было показано в недавнем мета-анализе ($n=4145$), пациентки с ХЭ имеют более низкие в сравнении с группой контроля шансы забеременеть, а также отношения живорождения к клинической беременности (ОШ 1,97, $p=0,02$ и ОШ 2,28, $p=0,002$, соответственно) [173]. Более того, тот же мета-анализ показал, что подтвержденное излечение ХЭ с помощью антибактериальной терапии может улучшить РЭ, что выражено в сопоставимых результатах экстракорпорального оплодотворения у этих пациенток и у пациенток без ХЭ в анамнезе. Таким образом, требуется более тщательное и методологически гомогенное изучение этиологии и патогенеза ХЭ.

4.4 Иммунные медиаторы в эндометриальном материале

За последние десятилетия менструальная кровь стала одним из основных и наиболее активно изучаемых источников мезенхимальных стволовых клеток для регенеративной медицины [150]. Однако диагностический или прогностический потенциал этого биоматериала практически не изучен. Данных об анализе каких-либо иммунных медиаторов в менструальной крови крайне мало.

В недавнем исследовании Y. Guterstam и соавт. анализировали панель из 20 цитокинов, хемокинов и факторов роста в парных образцах менструальной (собранной при помощи менструальной чаши) и периферической крови у 19 условно здоровых добровольцев [50]. Авторы продемонстрировали статистически значимые различия в уровнях всех анализируемых сигнальных молекул, кроме остеопонтинина. Наиболее выраженные отличия были показаны для IL-6, IL-1 β и IL-8 (в менструальной крови их уровни были выше, чем в периферической). Данные результаты подчеркивают, что менструальная кровь действительно может отражать содержание биомаркеров слизистой эндометрия. При сравнении паттернов уровней цитокинов, представленных на тепловой карте в работе Y. Guterstam и соавт., с таковыми в настоящем исследовании был обнаружен ряд небольших отличий, которые могут быть объяснены отличиями в подходе к сбору

биоматериала и к его анализу (контаминация биоматериала цитокинами из нижних отделов женского полового тракта на пути к менструальной чаше, отсутствие нормализации уровней иммунных медиаторов по общему белку и др.).

В еще одном исследовании по изучению уровней цитокинов в менструальной крови при ХЭ, обсужденному ранее, С. Tortorella и соавт. использовали подход к сбору биоматериала, подобный нашему (непосредственно из полости матки) [169]. Стоит отметить, что авторы не проводили нормализацию уровней цитокинов по общему белку и сообщали о сборе биоматериала в объеме более 0,5 мл, тогда как, по нашему опыту, сбор биоматериала в таком объеме был редко возможен, что и стало одной из причин для введения нормализации по общему белку. Так или иначе, в работе С. Tortorella и соавт. в ходе ROC-анализа было установлено, что модель выявления ХЭ по IL-6/TNF- α была крайне эффективна (AUC-ROC 0,989). К сожалению, во втором этапе нашего исследования не проводилось гистологическое исследование биоматериала из эндометрия, что не позволяет провести сравнение результатов. Как отмечалось ранее, ХЭ является важным предиктором снижения частоты наступления клинической беременности в ходе ВРТ и его неинвазивное выявление может представлять интерес. Таким образом, менструальная кровь может являться не только перспективным биоматериалом для оценки РЭ, но и для диагностики ХЭ.

Во втором этапе настоящего исследования было обнаружено, что уровни ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также ростовых факторов, имеющих отношение к стволовым клеткам (G-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, MCP-1, M-CSF*, TNF- β , TRAIL*, IP-10*, MIG* и SDF-1 α , SCF*), в менструальной крови повышены у пациенток, достигших клинической беременности в ходе ЭКО или ЭКО/ИКСИ. Разумеется, это свидетельствует не о наличии какого-либо выраженного воспаления эндометрия у данных пациенток, а скорее о его провоспалительном фенотипе и повышенном пролиферативном статусе, что многими авторами и признается как рецептивный эндометрий [69, 81].

Исследований, в которых бы анализировались цитокины в биоматериале из эндометрия не так много. Впрочем, есть 3 работы, в которых измерялись уровни 2-17 цитокинов в эндометриальном аспирате, собранном в день ПЭ [31, 92, 136]. Результаты данных исследований противоречат друг другу в отношении ассоциации уровней IL-1 β и TNF- α с РЭ, однако подтверждают результаты, полученные в настоящей работе в отношении повышения уровней IP-10* и MCP-1 при успешной имплантации. Это демонстрирует, что провоспалительный статус в эндометрии может наблюдаться не только в начале цикла, но и на всем его протяжении. Тот факт, что в данном исследовании уровни IP-10 в менструальном супернатанте пациенток с эндометриозом, оказались ниже, чем у пациенток без этого состояния, согласуются с результатами полученными другими авторами при анализе биоптата эндометрия и перитонеальной жидкости, хоть и статистическая значимость в данных случаях была пограничной [87, 187]. Таким образом, IP-10 может действительно быть медиатором эндометриоза, однако его значимость как диагностического или прогностического биомаркера этого состояния весьма ограничена.

4.5 Микробиота менструальной крови

Влияние эндометриальной микробиоты на РЭ до сих пор в полной мере неизвестно, а результаты доступных исследований противоречивы [61, 97, 170]. К сожалению, из-за выраженной методологической гетерогенности сопоставление их результатов крайне затруднено, из-за чего по сей день не было проведено ни одного мета-анализа по данной теме.

В настоящем исследовании не было обнаружено статистически значимой связи тех или иных параметров микробиологического профилирования менструальной крови с исходом ВРТ лечения. Однако 3 пациентки из группы не достигших беременности по результатам крио-ПЭ имели обсемененность биоматериала микроорганизмами Enterobacteriaceae или *Candida* spp. близкую к 100% (Рисунок 12), что с трудом можно классифицировать как «сбалансированное микробиологическое сообщество». Разумеется, данные случаи из-за низкой

встречаемости не достигли статистической значимости. Впрочем, при расширении выборки пациенток подобные случаи могут оказаться весьма релевантными.

Обнаруженная в настоящем исследовании положительная корреляция обсемененности *Lactobacillus* spp. с G-CSF и M-CSF может рассматриваться как возможный механизм позитивного влияния нормальной микробиоты (если предположить, что данная группа микроорганизмов действительно является «нормальной микробиотой» эндометрия [122]) на РЭ. Ведь известно, что оба вышеназванных цитокина могут способствовать росту и созреванию эндометрия, что крайне необходимо для успешной имплантации; более того, в настоящее время приводятся клинические исследования по их экзогенному применению при бесплодии [35, 83, 143]. Стоит отметить, что и в данном исследовании уровни G-CSF и M-CSF* оказались повышенными в менструальной крови пациенток из группы «беременность наступила».

4.6 Ограничения исследования

У этапов представленного исследования был ряд ограничений. Во-первых, группы пациенток были относительно небольшими, что не позволило построить комплексную непредвзятую многофакторную модель. Во-вторых, в этапе 2 исследования не применялись какие-либо меры по предотвращению контакта катетера для ПЭ со стенками шейки матки (например, использование внешнего катетера). Это было сделано для обеспечения минимальной травматичности процедуры. В-третьих, использованная микробиологическая панель для ПЦР-РВ была направлена на выявление микроорганизмов и вирусов, часто встречающихся в нижних отделах женского полового тракта, однако она не способна дать полное представление о микробиоме той или иной среды. В-четвертых, в этапе 1 исследования биопсия эндометрия (как и сбор биоматериала в целом) проводились на разных днях менструального цикла в соответствии с назначаемым лечащим врачом планом ведения пациенток. Таким образом, результаты первого этапа не учитывают возможные флуктуации в структуре микробиоты женского полового тракта по ходу менструального цикла. В-пятых, из-за поискового дизайна

исследования критерии для поправки на множественные сравнения не были жесткими. Работа была нацелена на сужение списка потенциальных биомаркеров РЭ менструальной крови для будущих исследований с этим биоматериалом и на выявление наиболее многообещающих аналитов, а не категоричное установление биомаркеров РЭ.

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.

Отсутствие значимых связей между всеми параметрами микробиологического профилирования, кроме обсемененности *Megasphaera* spp. + *Veillonella* spp. + *Dialister* spp. и ХЭ, с одной стороны, может показывать, что при данном состоянии аутоиммунный фактор может играть немалую роль, а с другой, что сами критерии этого во многом суррогатного диагноза являются несовершенными. Подтверждением последнему тезису является тот факт, что в нашей когорте переход от критерия «5 клеток в поле зрения», к не менее часто применяемому в литературе критерию «1 клетка в поле зрения» приводил к драматическому изменению частоты выявляемости ХЭ: от 11% до 83%.

Установленное в ходе сравнения структуры микробиоты и вирусных статусов менструальной крови отсутствие различий между пациентками, достигшими и не достигшими беременности по результатам крио-ПЭ, может быть следствием как ограниченной выборки пациенток, так и того, что роль микробиоты в модуляции РЭ не столь высока. Впрочем, выявление трех случаев, в которых обсемененность биоматериала микроорганизмами Enterobacteriaceae или *Candida* spp. была близка к 100%, в группе «беременность не наступила» подчеркивает необходимость более индивидуального подхода к анализу эндометриальной микробиоты при оценке РЭ.

Менструальная кровь предоставляет уникальную возможность изучения различных параметров (как молекулярных, так и микробиологических) эндометрия в начале цикла ПЭ. С клинической точки зрения, данный момент идеален 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.

Перечень сокращений и условных обозначений

ВМИ – внутриматочная инсеминация

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

Группа «беременность наступила» – группа пациенток с рецептивным эндометрием (наступившая в результате криопереноса эмбриона беременность)

Группа «беременность не наступила» – группа пациенток с нерецептивным эндометрием (не наступившая в результате криопереноса эмбриона беременность)

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

КАТ – каталаза

ЛГ – лютеинизирующий гормон

Н/Д – нет данных

ОАС – общая антиоксидантная сила

ОТГ – общий уровень тиоловых групп

ОШ – отношение шансов

ПОЛ – пероксидация липидов

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЭ – перенос эмбриона

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РЭ – рецептивность эндометрия

СОД – супероксиддисмутаза

СОР – снижение овариального резерва

ХЭ – хронический эндометрит

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

AUC – area under the curve
 CD – cluster of differentiation
 CTACK – Cutaneous T cell-attracting chemokine
 DH – Dickkopf homolog
 FGF – Fibroblast growth factor
 G-CSF – Granulocyte colony-stimulating factor
 GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
 GRO – Growth regulated oncogene
 HBEGF – Heparin binding Epidermal growth factor like growth factor
 hDP – Human decidua-associated protein
 IFN – Interferon
 IL – Interleukin
 IP – interferon γ induced protein
 LIF – Leukemia inhibitory factor
 LRG – Leucine-rich glycoprotein
 MCP – Monocyte chemotactic protein
 M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor
 MIF – Macrophage migration inhibitory factor
 MIG – Monokine induced by interferon γ
 MIP – Macrophage inflammatory protein
 NGF – Nerve growth factor
 PDGF – Platelet-derived growth factor
 RANTES – Regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted
 ROC – receiver operating characteristic
 r_s – Spearman's rank correlation coefficient
 SCF – Stem cell factor
 SCGF – Stem cell growth factor
 SDF – Stromal cell-derived factor
 spp. – species

TNF – Tumor necrosis factor

TRAIL – Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

VEGF – Vascular endothelial growth factor

Список литературы

1. Адамян, Л. В. Миома матки и микробиота эндометрия: имеется ли взаимосвязь? / Л. В. Адамян [и др.] // Проблемы Репродукции. – 2022. – Т. 28, N 6. – С. 164–169.
2. Барина, В. В. Микробиом эндометрия у женщин с многократными неудачами экстракорпорального оплодотворения / В. В. Барина [и др.] // Вопросы Гинекологии, Акушерства и Перинатологии. – 2021. – Т. 20, N 3. – С. 5–11.
3. Довгань, А. А., Зиганшина, М. М., Долгушина, Н. В. Современные тренды в поиске маркеров рецептивности эндометрия - от отдельных параметров к комплексному подходу / А. А. Довгань, М. М. Зиганшина, Н. В. Долгушина // Акушерство и Гинекология. – 2020. – N 11. – С. 26–32.
4. Кебурия, Л. К. Микробиота эндометрия и репродуктивный исход в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Л. К. Кебурия [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2020. – N 4. – С. 166–172.
5. Озерская, И. А. Динамическая эхография матки у женщин пре- и постменопаузального периодов / И. А. Озерская [и др.] // Ультразвуковая и Функциональная диагностика. – 2007. – N 2. – С. 49–57.
6. Озерская, И. А., Семилетова А. А., Казарян Г. Г. Ультразвуковая диагностика эндометрита (В-режим) / И. А. Озерская, А. А. Семилетова, Г. Г. Казарян // Ультразвуковая и Функциональная диагностика. – 2017. – N 6. – С. 36–52.
7. Оразов, М. Р. Тайны репродуктивных неудач: «тонкий» эндометрий / М. Р. Оразов [и др.] // Репродуктивная медицина. – 2018. – Т. 2, N 35. – С. 7–17.
8. Оразов, М. Р. «Проблемный» эндометрий как фактор бесплодия: поиск путей преодоления продолжается / М. Р. Оразов [и др.] // Трудный пациент. – 2020. – Т. 18 N 8–9. – С. 13–19.
9. Рабаданова, А. К., Шалина, Р. И., Гугушвили, Н. А. Гемодинамика матки и состояние овариального резерва и в оценке эффективности экстракорпорального оплодотворения / А. К. Рабаданова, Р. И. Шалина, Н. А. Гугушвили // Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. – 2018. – N 2. – С. 52–

59.

10. Радецкая, Л. Е. Женское бесплодие: диагностика проблемы и пути преодоления / Л. Е. Радецкая [и др.] // Охрана Материнства и Детства. – 2019. – Т. 33, N 1. – С. 42–47.

11. Силивончик, Н. Н. Микробиота желудочно-кишечного тракта и иммунитет / Н. Н. Силивончик // Рецепт. – 2021. – Т. 24, N 3. – С. 323–331.

12. Соломатина, А. А. 3D-УЗИ в оценке имплантационных свойств эндометрия после органосохраняющих операций по поводу эндометриоидных кист яичников / А. А. Соломатина // Доктор.Ру. – 2020. – Т. 19, N 8. – С. 66–70.

13. Тапильская, Н. И. Микробиота эндометрия женщин с хроническим эндометритом и идиопатическим бесплодием / Н. И. Тапильская [и др.]// Акушерство и Гинекология. – 2020. – N 4. – Р. 72–81.

14. Турок, И. В., Улезко, Е. А. Оценка ультразвуковых маркеров рецептивности эндометрия с целью прогнозирования имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы) / И. В. Турок, Е. А. Улезко // Репродуктивное Здоровье. Восточная Европа. – 2020. – Т. 10, N 1. – С. 83–92.

15. Цыпурдеева, Н. Д. Состав микробиоты эндометрия и степень выраженности хронического эндометрита у пациенток с неэффективными протоколами экстракорпорального оплодотворения. Есть ли связь? / Н. Д. Цыпурдеева [и др.]// Журнал Акушерства и Нервных Болезней. – 2019. – Т. 67, N 2. – С. 5–15.

16. Шумилин, М. А. Роль микробиоты в развитии различных патологий / М. А. Шумилин // NOVAINFO.RU. – 2021. – N 126. – С. 127–128.

17. Achilles, S. L. Impact of contraceptive initiation on vaginal microbiota / S. L. Achilles [et al.]// American journal of obstetrics and gynecology. – 2018. – Vol. 218, N 6. – С. 622.e1-622.e10.

18. Al-Ghamdi, A. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome / A. Al-Ghamdi [et al.] // Reproductive biology and endocrinology : RB&E. – 2008. – Vol. 6. – С. 37.

19. Altmäe, S. Guidelines for the design, analysis and interpretation of «omics» data: Focus on human endometrium / S. Altmäe [et al.] // Human Reproduction Update. – 2014. – Vol. 20, N 1. – P. 12–28.
20. Armstrong, R. A. When to use the Bonferroni correction / R. A. Armstrong // Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists). – 2014. – Vol. 34, N 5. – C. 502–508.
21. Austin, K. L., León R. Candida albicans endometritis as a cause of reproductive dysfunction. Report of a case / K. L. Austin, R. León // Revista medica de Panama. 1987. – Vol. 12, N 2. – P. 79–85.
22. Baker, J. M., Chase D. M., Herbst-Kralovetz M. M. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? / J. M. Baker, D. M. Chase, M. M. Herbst-Kralovetz // Frontiers in immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 208.
23. Baltaci, V. Relationship between embryo quality and aneuploidies / V. Baltaci [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2006. – Vol. 12, N 1. – P. 77–82.
24. Barash, A. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization / A. Barash [et al.] // Fertility and Sterility. – 2003. – Vol. 79, N 6. – P. 1317–1322.
25. Bassil, S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization / S. Bassil // Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2001. – Vol. 18, N 3. – P. 258–263.
26. Bémer, P. Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study / P. Bémer [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2014. – Vol. 52, N 10. – P. 3583–3589.
27. Bentin-Ley, U. Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile and fertile women / U. Bentin-Ley [et al.] // European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. – 2011. – Vol. 156, N 1. – P. 60–66.

28. Bergh, C., Hillensjö, T., Nilsson, L. Sonographic evaluation of the endometrium in in vitro fertilization IVF cycles. A way to predict pregnancy? / C. Bergh, T. Hillensjö, L. Nilsson // *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. – 1992. – Vol. 71, N 8. – P. 624–628.
29. Blazheva, S. P-415 Study of the incidence of herpes viruses in the endometrium of women with evidence of chronic endometritis and reproductive problems / S. Blazheva // *Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 37, N 1. – deac107.392.
30. Bloise, E. Activin A in mammalian physiology / E. Bloise [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99, N 1. – P. 739–780.
31. Boomsma, C. M. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF / C. M. Boomsma [et al.] // *Human Reproduction*. – 2009. – Vol. 24, N 6. – P. 1427–1435.
32. Boomsma, C. M. Cytokine profiling in endometrial secretions: A non-invasive window on endometrial receptivity / C. M. Boomsma [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2009. – Vol. 18, N 1. – P. 85–94.
33. Bozdag, G., Esinler, I., Yarali, H. The impact of endometrial thickness and texture on intracytoplasmic sperm injection outcome / G. Bozdag, I. Esinler, H. Yarali // *The Journal of reproductive medicine*. – 2009. – Vol. 54, N 5. – P. 303–311.
34. Bozorgmehr, M. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application / M. Bozorgmehr [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – 497.
35. Budrys, N. M. Increased expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in patients with endometriosis / N. M. Budrys [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2012. – Vol. 97, N 5. – P. 1129–35.e1.
36. Butler, B. Value of endometrial cultures in sterility investigation / B. Butler // *Fertility and sterility*. 1958. – Vol. 9, N 3. – P. 269–273.
37. Camargo-Díaz, F. Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy / F. Camargo-Díaz [et al.] // *BMC Women's Health*. – 2017. – Vol. 17, N 1. – 63.

38. Carosso, A. Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: a pilot study / A. Carosso [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2020. – Vol. 37, N 9. – P. 2315–2326.
39. Cha, J., Sun, X., Dey, S. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy / J. Cha, X. Sun, S. Dey // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18, N 12. – P. 1754–1767.
40. Chen, C. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases / C. Chen // *Nature communications*. – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 875.
41. Chen, P. Interaction Between Chronic Endometritis Caused Endometrial Microbiota Disorder and Endometrial Immune Environment Change in Recurrent Implantation Failure / P. Chen [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 748447.
42. Chen, S. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study / S. Chen [et al.] // *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. – 2010. – Vol. 8. – P. 30.
43. Cheong, Y. Uterine secretomics: A window on the maternal-embryo interface / Y. Cheong [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2013. – Vol. 99, N 4. – P. 1093–1099.
44. Cicinelli, E. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment / E. Cicinelli [et al.] // *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*. – 2014. – Vol. 21, N 5. – P. 640–7.
45. Cicinelli, E. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy / E. Cicinelli [et al.] // *Human Reproduction*. – 2015. – Vol. 30, N 2. – P. 323–330.
46. Ciepiela, P. Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome / P. Ciepiela [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2018. – Vol. 35, N 7. – P. 1265–1276.
47. Corbacioğlu, A., Baysal, B. Effects of endometrial thickness and echogenic

pattern on assisted reproductive treatment outcome / A. Corbacioğlu, B. Baysal // *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. – 2009. – Vol. 36, N 3. – P. 145–147.

48. Coulam, C. B. Ultrasonographic predictors of implantation after assisted reproduction / C. B. Coulam [et al.] // *Fertility and sterility*. – 1994. – Vol. 62, N 5. – P. 1004–1010.

49. Craciunas, L. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: A systematic review and meta-analysis / L. Craciunas [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Vol. 25, N 2. – P. – 202–223.

50. Guterstam, Y. The cytokine profile of menstrual blood / Y. Guterstam [et al.] // *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. – 2021. – Vol. 100, N 2. – P. 339–346.

51. Díaz-Gimeno, P. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature / P. Díaz-Gimeno [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95, N 1. – P. 50–60.

52. Diaz-Martínez, M. D. Impact of the Vaginal and Endometrial Microbiome Pattern on Assisted Reproduction Outcomes / M. D. Diaz-Martínez [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2021. – Vol. 10, N 18. – 4063.

53. Dickey, R. P. Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproduction technologies / R. P. Dickey [et al.] // *Human reproduction*. – 1992. – Vol. 7, N 3. – P. 418–421.

54. Duffy, J. M. N. Standardizing definitions and reporting guidelines for the infertility core outcome set: An international consensus development study / J. M. N. Duffy [et al.] // *Human Reproduction*. – 2020. – Vol. 35, N 12. – P. 2735–2745.

55. Eggert-Kruse, W. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? / W. Eggert-Kruse [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2009. – Vol. 91, N 1. – P. 67–82.

56. Enciso, M. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis / M. Enciso [et al.] // *Human Reproduction*. – 2018. – Vol. 33, N 2. – P. 220–228.

57. Florio, P. Identification of urocortin mRNA and peptide in the human endometrium / P. Florio [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2002. – Vol. 173, N 2. – P.

R9-14.

58. Florio, P. Endometrial expression and secretion of activin A, but not follistatin, increase in the secretory phase of the menstrual cycle / P. Florio [et al.] // *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. – 2003. – Vol. 10, N 4. – P. 237–243.

59. Florio, P. Evaluation of endometrial urocortin secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination / P. Florio [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2008. – Vol. 54, N 2. – P. 350–355.

60. Florio, P. Evaluation of endometrial activin A secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination / P. Florio [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2010. – Vol. 93, N 7. – P. 2316–2320.

61. Franasiak, J. M. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit / J. M. Franasiak [et al.] // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2016. – Vol. 33, N 1. – P. 129–136.

62. Gaast, M. van der Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates / M. van der Gaast [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2003. – Vol. 7. – P. 105–109.

63. Gajer, P. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota / P. Gajer [et al.] // *Science translational medicine*. – 2012. – Vol. 4, N 132. – P. 132ra52.

64. Gazvani, R. Does *Candida Albicans* Play a Role in the Etiology of Endometriosis? / R. Gazvani [et al.] // *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders*. – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. 2–9.

65. Gdanska, P. Anxiety and depression in women undergoing infertility treatment / P. Gdanska [et al.] // *Ginekologia Polska*. – 2017. – Vol. 88, N 2. – P. 109–112.

66. Gillott, D. J. Specific isoforms of leucine-rich $\alpha 2$ -glycoprotein detected in the proliferative endometrium of women undergoing assisted reproduction are associated with spontaneous pregnancy / D. J. Gillott [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2008. – Vol. 90, N 3. – P. 761–768.

67. Golan, A. Human decidua-associated protein – 200 levels in uterine fluid at hysteroscopy / A. Golan [et al.] // *Gynecologic and Obstetric Investigation*. – 1994. – Vol. 38, N 4. – P. 217–219.

68. Gonen, Y., Casper, R. F. Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF) / Y. Gonen, R. F. Casper // Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF. – 1990. – Vol. 7, N 3. – P. 146–152.

69. Granot, I., Gnainsky, Y., Dekel, N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome / I. Granot, Y. Gnainsky, N. Dekel // Reproduction. – 2012. – Vol. 144, N 6. – P. 661–668.

70. Halperin, R. Identification, immunoaffinity purification and partial characterization of a human decidua-associated protein / R. Halperin [et al.] // Journal of Reproduction and Fertility. – 1990. – Vol. 88, N 1. – P. 159–165.

71. Halperin, R. Implantation: Uterine fluid human decidua-associated protein – 200 and implantation after embryo transfer / R. Halperin [et al.] // Human Reproduction. – 1995. – Vol. 10, N 4. – P. 907–910.

72. Halperin, R. Measurement of intrauterine human decidua-associated protein – 200 and diagnosis of ectopic pregnancy / R. Halperin [et al.] // Gynecologic and Obstetric Investigation. – 1998. – Vol. 45, N 4. – P. 225–228.

73. Hirata, K. Histological diagnostic criterion for chronic endometritis based on the clinical outcome / K. Hirata [et al.] // BMC women's health. – 2021. – Vol. 21, N 1. – P. 94.

74. Hoogenhuijze, N. E. Endometrial scratching prior to IVF; does it help and for whom? A systematic review and meta-analysis / N. E. Hoogenhuijze [et al.] // Human Reproduction Open. – 2019. – Vol. 2019, N 1. – P. hoy025.

75. Houser, B. Bio-rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview / B. Houser // Archives of Physiology and Biochemistry. – 2012. – Vol. 118, N 4. – P. 192–196.

76. Ichiyama, T. Analysis of vaginal and endometrial microbiota communities in infertile women with a history of repeated implantation failure / T. Ichiyama [et al.] // Reproductive medicine and biology. – 2021. – Vol. 20, N 3. – P. 334–344.

77. Ida, A. IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies / A. Ida [et al.] // Journal of Reproductive

Immunology. – 2000. – Vol. 47, N 1. – P. 65–74.

78. Jain, M. Mucosal biomarkers for endometrial receptivity: A promising yet underexplored aspect of reproductive medicine / M. Jain [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2022. – Vol. 68, N 1. – P. 13–24.

79. Jandhyala, S. M. Role of the normal gut microbiota / S. M. Jandhyala [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21, N 29. – P. 8787–8803.

80. Järvelä, I. Y. Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using three-dimensional power Doppler ultrasound / I. Y. Järvelä [et al.] // *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. – 2005. – Vol. 26, N 7. – P. 765–769.

81. Jin, X. H., Li, Y., Li, D. Intrauterine interventions for women with two or more implantation failures: A systematic review and network meta-analysis / X. H. Jin, Y. Li, D. Li // *Frontiers in endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 959121.

82. Jin, X. Y. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles / X. Y. Jin [et al.] // *Human Reproduction*. – 2017. – Vol. 32, N 12. – P. 2394–2403.

83. Jindal, P. C., Singh, R., Singh, M. O-026 RCT of INTRA - Uterine administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) before embryo-transfer in resistant thin endometrium in IVF-ICSI cycles / P. C. Jindal, R. Singh, M. Singh // *Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 37, N 1. – deac104.026.

84. Jinno, M. Measurement of endometrial tissue blood flow: A novel way to assess uterine receptivity for implantation / M. Jinno [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2001. – Vol. 76, N 6. – P. 1168–1174.

85. Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. – 2008. – Vol. 295, N 4. – P. C849–C868.

86. Jones, R. L. Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception / R. L. Jones // *Molecular Human Reproduction*. – 2000. – Vol. 6, N 12. – P. 1107–1117.

87. Jørgensen, H. Endometrial cytokines in patients with and without endometriosis

evaluated for infertility / H. Jørgensen // Fertility and sterility. – 2022. – Vol. 117, N 3. – P. 629–640.

88. Kadogami, D., Nakaoka, Y., Morimoto, Y. Use of a vaginal probiotic suppository and antibiotics to influence the composition of the endometrial microbiota / D. Kadogami, Y. Nakaoka, Y. Morimoto // Reproductive biology. – 2020. – Vol. 20, N 3. – P. 307–314.

89. Kao, L. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation / L. Kao [et al.] // Endocrinology. – 2002. – Vol. 143, N 6. – P. 2119–2138.

90. Kao, L. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility / L. Kao [et al.] // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144, N 7. – P. 2870–2881.

91. Kehila, M. [Endometrial thickness in in vitro fertilization. A study of 414 cases] / M. Kehila [et al.] // La Tunisie medicale. – 2010. – Vol. 88, N 12. – P. 928–932.

92. Khadem, N. Association of il-1 and tnf- α levels in endometrial secretion and success of embryo transfer in ivf/icsi cycles / N. Khadem [et al.] // International Journal of Fertility and Sterility. – 2019. – Vol. 13, N 3. – P. 236–239.

93. Kinay, T. The relationship between endometrial thickness and pregnancy rates in GnRH antagonist down-regulated ICSI cycles / T. Kinay [et al.] // Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. – 2010. – Vol. 26, N 11. – P. 833–837.

94. Kovachev, E. Measurement of endometrial volume and endometrial thickness for assessment of endometrial receptivity in assisted reproductive techniques / E. Kovachev [et al.] // Akusherstvo i ginekologiya. – 2005. – Vol. 44. – P. 27–33.

95. Kovacs, P. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome / P. Kovacs [et al.] // Human reproduction. – 2003. – Vol. 18, N 11. – P. 2337–2341.

96. Krivonosov, S. K., Mikhailov, A. T., Tatarinov, I. S. Comparative immunochemical analysis of specific beta globulins of the «pregnancy zone» of the humans and other mammals / S. K. Krivonosov, A. T. Mikhailov, I. S. Tatarinov // Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny. 1979. – Vol. 88, N 7. – P. 51–53.

97. Kyono, K. A pilot study and case reports on endometrial microbiota and

pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium / K. Kyono [et al.] // *Reproductive medicine and biology*. – 2019. – Vol. 18, N 1. – P. 72–82.

98. Laird, S. M. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: Presence in uterine flushings and production by cells in culture / S. M. Laird [et al.] // *Human Reproduction*. – 1997. – Vol. 12, N 3. – P. 569–574.

99. Laird, S. M., Tuckerman E. M., Li T. – P. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage / S. M. Laird, E. M. Tuckerman, T. Li // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2006. – Vol. 13, N 1. – P. 13–23.

100. Lédée-Bataille, N. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation / N. Lédée-Bataille [et al.] // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 213–218.

101. Lédée-Bataille, N. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer / N. Lédée-Bataille [et al.] // *Human Reproduction*. – 2004. – Vol. 19, N 9. – P. 1968–1973.

102. Lee, S., Lee, D. K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? / S. Lee, D. K. Lee // *Korean journal of anesthesiology*. – 2018. – Vol. 71, N 5. – P. 353–360.

103. Lensen, S., Sadler, L., Farquhar, C. Endometrial scratching for subfertility: Everyone's doing it / S. Lensen, L. Sadler, C. Farquhar // *Human Reproduction*. – 2016. – Vol. 31, N 6. – P. 1241–1244.

104. Leoni, C. Human Endometrial Microbiota at Term of Normal Pregnancies / C. Leoni // *Genes*. – 2019. – Vol. 10, N 12. – 971.

105. Lesny, P. Ultrasound evaluation of the uterine zonal anatomy during in-vitro fertilization and embryo transfer / P. Lesny [et al.] // *Human reproduction (Oxford, England)*. – 1999. – Vol. 14, N 6. – P. 1593–1598.

106. Lessey, B. A., Young, S. L. What exactly is endometrial receptivity? / B. A. Lessey, S. L. Young // *Fertility and Sterility*. – 2019. – Vol. 111, N 4. – P. 611–617.

107. Li, F. The metagenome of the female upper reproductive tract / F. Li [et al.] //

GigaScience. – 2018. – Vol. 7, N 10. – giy107.

108. Li, R., Hao, G. Local injury to the endometrium: Its effect on implantation / R. Li, G. Hao // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. – 2009. – Vol. 21, N 3. – P. 236–239.

109. Li, Y. Diagnosis of chronic endometritis: How many CD138(+) cells/HPF in endometrial stroma affect pregnancy outcome of infertile women? / Y. Li [et al.] // American journal of reproductive immunology. – 2021. – Vol. 85, N 5. – P. e13369.

110. Liu, C. A multifunctional role of leucine-rich a-2-glycoprotein 1 in cutaneous wound healing under normal and diabetic conditions / C. Liu [et al.] // Diabetes. – 2020. – Vol. 69, N 11. – P. 2467–2480.

111. Liu, N. Mycobiome Dysbiosis in Women with Intrauterine Adhesions / N. Liu [et al.] // Microbiology spectrum. – 2022. – Vol. 10, N 4. – P. e0132422.

112. Liu, Y. Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method / Y. Liu [et al.] // Fertility and sterility. – 2019. – Vol. 112, N 4. – P. 707-717.e1.

113. Lozano, F. M. Characterization of the vaginal and endometrial microbiome in patients with chronic endometritis / F. M. Lozano [et al.] // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2021. – Vol. 263. – P. 25–32.

114. Maia-Filho, V. O. A. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and E-cadherin expression in the endometrium during the implantation window of infertile women before in vitro fertilization treatment / V. O. A. Maia-Filho [et al.] // Reproductive Sciences. – 2015. – Vol. 22, N 4. – P. 416–422.

115. Massarotti, C. Impact of infertility and infertility treatments on quality of life and levels of anxiety and depression in women undergoing in vitro fertilization / C. Massarotti [et al.] // Gynecological Endocrinology. – 2019. – Vol. 35, N 6. – P. 485–489.

116. Massimiani, M. Molecular signaling regulating endometrium–blastocyst crosstalk / M. Massimiani [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, N 1. – 23.

117. Mercé, L. T. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome? / L.

T. Mercé [et al.] // Fertility and sterility. – 2008. – Vol. 89, N 1. – P. 111–117.

118. Miles, S. M., Hardy, B. L., Merrell, D. S. Investigation of the microbiota of the reproductive tract in women undergoing a total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy / S. M. Miles, B. L. Hardy, D. S. Merrell // Fertility and sterility. – 2017. – Vol. 107, N 3. – P. 813-820.e1.

119. Mitchell, C. M. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women / C. M. Mitchell [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2015. – Vol. 212, N 5. – P. 611–619.e1.

120. Molina, N. M. Analysing endometrial microbiome: methodological considerations and recommendations for good practice / N. M. Molina [et al.] // Human reproduction. – 2021. – Vol. 36, N 4. – P. 859–879.

121. Moreno, I. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure / I. Moreno [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2016. – Vol. 215, N 6. – P. 684–703.

122. Moreno, I. Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients / I. Moreno [et al.] // Microbiome. – 2022. – Vol. 10, N 1. – P. 1.

123. Mouzon, J. de International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology – 2012 / J. de Mouzon [et al.] // Human Reproduction. – 2020. – Vol. 35, N 8. – P. 1900–1913.

124. Nagy, B. Follicular fluid progesterone concentration is associated with fertilization outcome after IVF: a systematic review and meta-analysis / B. Nagy [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2019. – Vol. 38, N 6. – P. 871–882.

125. Ness, R. B. Can known risk factors explain racial differences in the occurrence of bacterial vaginosis? / R. B. Ness [et al.] // Journal of the National Medical Association. – 2003. – Vol. 95, N 3. – P. – 201–212.

126. Novembri, R. Urocortin 2 and urocortin 3 in endometriosis: Evidence for a possible role in inflammatory response / R. Novembri [et al.] // Molecular Human Reproduction. – 2011. – Vol. 17, N 9. – P. 587–593.

127. Okohue, J. E. The effect of endometrial thickness on in vitro fertilization

(IVF)-embryo transfer/intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome / J. E. Okohue [et al.] // African journal of reproductive health. – 2009. – Vol. 13, N 1. – P. 113–121.

128. Olomu, I. N. Elimination of “kitome” and “splashome” contamination results in lack of detection of a unique placental microbiome / I. N. Olomu [et al.] // BMC Microbiology. – 2020. – Vol. 20, N 1. – P. 157.

129. Oron, G. The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: A pilot study / G. Oron [et al.] // Human Reproduction. – 2014. – Vol. 29, N 7. – P. 1444–1451.

130. Othman, R. Microarray profiling of secretoryphase endometrium from patients with recurrent miscarriage / R. Othman [et al.] // Reproductive Biology. – 2012. – Vol. 12, N 2. – P. 183–199.

131. Paniagua Voirol, L. R. How the «kitome» influences the characterization of bacterial communities in lepidopteran samples with low bacterial biomass / L. R. Paniagua Voirol [et al.] // Journal of applied microbiology. – 2021. – Vol. 130, N 6. – P. 1780–1793.

132. Pelzer, E. S. A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding / E. S Pelzer. [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2018. – Vol. 111, N 6. – P. 933–943.

133. Peterson, J. The NIH Human Microbiome Project / J. Peterson [et al.] // Genome research. – 2009. – Vol. 19, N 12. – P. 2317–2323.

134. Popovici, R., Kao, L., Giudice, L. Discovery of New Inducible Genes in in vitro Decidualized Human Endometrial Stromal Cells Using Microarray Technology / R. Popovici, L. Kao, L. Giudice // Endocrinology. – 2000. – Vol. 141, N 9. – P. 3510–3515.

135. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion / Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine // Fertility and Sterility. – 2013. – Vol. 99, N 1. – P. 63.

136. Rahiminejad, M. E. The relationship between some endometrial secretion cytokines and in vitro fertilization / M. E. Rahiminejad [et al.] // Iranian Journal of Reproductive Medicine. – 2015. – Vol. 13, N 9. – P. 557–562.

137. Rahiminejad, M. E. Oxidative stress biomarkers in endometrial secretions: A comparison between successful and unsuccessful in vitro fertilization cycles / M. E. Rahiminejad [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 116. – P. 70–75.
138. Rashidi, B. H. Relationships between pregnancy rates following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and endometrial thickness and pattern / B. H. Rashidi [et al.] // *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. – 2005. – Vol. 120, N 2. – P. 179–184.
139. Reschini, M. Endometrial microbiome: sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation / M. Reschini [et al.] // *Scientific reports*. – 2022. – Vol. 12, N 1. – P. 8467.
140. Reyes, T. M. Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors / T. M. Reyes [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, N 5. – P. 2843–2848.
141. Richter, K. S. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos / K. S. Richter [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2007. – Vol. 87, N 1. – P. 53–59.
142. Riganelli, L. Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility / L. Riganelli [et al.] // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 350.
143. Rocha, M. N. de C., Florêncio, R. de S., Alves, R. R. F. The role played by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on women submitted to in vitro fertilization associated with thin endometrium: systematic review / M. N. de C. Rocha, R. de S. Florêncio, R. R. F. Alves // *JBRA assisted reproduction*. – 2020. – Vol. 24, N 3. – P. 278–282.
144. Rodriguez, M., Okagaki, T., Richart, R. M. Mycotic endometritis due to *Candida*. A case report / M. Rodriguez, T. Okagaki, R. M. Richart // *Obstetrics and gynecology*. 1972. – Vol. 39, N 2. – P. 292–294.

145. Romero, R., Espinoza, J., Mazor, M. Can endometrial infection/inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization? / R. Romero, J. Espinoza, M. Mazor // *Fertility and sterility*. – 2004. – Vol. 82, N 4. – P. 799–804.
146. Ruiz-Alonso, M. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure / M. Ruiz-Alonso [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2013. – Vol. 100, N 3. – P. 818–824.
147. Sakamoto, C. Sonographic study of the endometrial responses to ovarian hormones in patients receiving ovarian stimulation / C. Sakamoto [et al.] // *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 1988. – Vol. 27, N 3. – P. 407–414.
148. Sakumoto, T. Hysteroscopic assessment of midsecretory-phase endometrium, with special reference to the luteal-phase defect / T. Sakumoto [et al.] // *Hormone Research in Paediatrics*. – 1992. – Vol. 37. – P. 48–52.
149. Salter, S. J. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses / S. J. Salter [et al.] // *BMC biology*. – 2014. – Vol. 12. – P. 87.
150. Sanchez-Mata, A., Gonzalez-Muñoz, E. Understanding menstrual blood-derived stromal/stem cells: Definition and properties. Are we rushing into their therapeutic applications? / A. Sanchez-Mata, E. Gonzalez-Muñoz // *iScience*. – 2021. – Vol. 24, N 12. – P. 103501.
151. Santi, A. The hysteroscopic view of infertility: The mid-secretory endometrium and treatment success towards pregnancy / A. Santi [et al.] // *Gynecological Surgery*. – 2012. – Vol. 9, N 2. – P. 147–150.
152. Sar-Shalom Nahshon, C. The impact of intentional endometrial injury on reproductive outcomes: A systematic review and meta-analysis / C. Sar-Shalom Nahshon [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Vol. 25, N 1. – P. 95–113.
153. Schild, R. L. Three-dimensional endometrial volume calculation and pregnancy rate in an in-vitro fertilization programme / R. L. Schild [et al.] // *Human reproduction*. – 1999. – Vol. 14, N 5. – P. 1255–1258.

154. Schild, R. L. Endometrial receptivity in an in vitro fertilization program as assessed by spiral artery blood flow, endometrial thickness, endometrial volume, and uterine artery blood flow / R. L. Schild [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2001. – Vol. 75, N 2. – P. 361–366.
155. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body / R. Sender, S. Fuchs, R. Milo // *PLoS biology*. – 2016. – Vol. 14, N 8. – P. e1002533–e1002533.
156. Senju, H. Effect of IL-18 on the expansion and phenotype of human natural killer cells: Application to cancer immunotherapy / H. Senju [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2018. – Vol. 14, N 3. – P. 331–340.
157. Sharara, F. I., Lim, J., McClamrock, H. D. Endometrial pattern on the day of oocyte retrieval is more predictive of implantation success than the pattern or thickness on the day of hCG administration / F. I. Sharara, J. Lim, H. D. McClamrock // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 1999. – Vol. 16, N 10. – P. 523–528.
158. Sher, G. Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET) / G. Sher [et al.] // *Human reproduction*. – 1991. – Vol. 6, N 2. – P. 232–237.
159. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 180–183.
160. Singh, N. Predictive value of endometrial thickness, pattern and sub-endometrial blood flows on the day of hCG by 2D doppler in in-vitro fertilization cycles: A prospective clinical study from a tertiary care unit / N. Singh [et al.] // *Journal of human reproductive sciences*. – 2011. – Vol. 4, N 1. – P. 29–33.
161. Smeltz, R. B. Regulation of interleukin (IL)-18 receptor α chain expression on CD4⁺ T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation: Critical downregulatory role of IL-4 / R. B. Smeltz [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 194, N 2. – P. 143–153.
162. Smith, B. Ultrasonic assessment of endometrial changes in stimulated cycles in an in vitro fertilization and embryo transfer program / B. Smith [et al.] // *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF*. 1984. – Vol. 1, N 4. – P. 233–238.

163. Sola-Leyva, A. Mapping the entire functionally active endometrial microbiota / A. Sola-Leyva [et al.] // Human reproduction. – 2021. – Vol. 36, N 4. – P. 1021–1031.
164. Sun, H. Global, Regional, and National Prevalence and Disability-Adjusted Life-Years for Infertility in 195 Countries and Territories, – 1990-2017: Results from a Global Burden of Disease Study, – 2017 / H. Sun [et al.] // Aging. – 2019. – Vol. 11, N 23. – P. 10952–10991.
165. Tabibzadeh, S., Babaknia, A. Molecular aspects of implantation: The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion / S. Tabibzadeh, A. Babaknia // Human Reproduction. – 1995. – Vol. 10, N 6. – P. 1579–1602.
166. Tan, J. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2018. – Vol. 35, N 4. – P. 683–692.
167. Tissier, H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons:(état normal et pathologique) / H. Tissier // Paris Thesis. – 1900. – 1.
168. Torricelli, M. Secretory endometrium highly expresses urocortin messenger RNA and peptide: Possible role in the decidualization process / M. Torricelli [et al.] // Human Reproduction. – 2007. – Vol. 22, N 1. – P. 92–96.
169. Tortorella, C. Interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis / C. Tortorella [et al.] // Fertility and Sterility. – 2014. – Vol. 101, N 1. – P. 242–247.
170. Toson, B., Simon, C., Moreno, I. The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human Conception / B. Toson, C. Simon, I. Moreno // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, N 1. – 485.
171. Uchida, H. Glycodelin in reproduction / H. Uchida [et al.] // Reproductive Medicine and Biology. – 2013. – Vol. 12, N 3. – P. 79–84.
172. Vitagliano, A. Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis / A. Vitagliano [et al.] // Fertility and Sterility. – 2018. – Vol. 110, N 1. – P. 103-112.e1.

173. Vitagliano, A. Chronic Endometritis in Infertile Women: Impact of Untreated Disease, Plasma Cell Count and Antibiotic Therapy on IVF Outcome—A Systematic Review and Meta-Analysis / A. Vitagliano [et al.] // *Diagnostics*. – 2022. – Vol. 12, N 9. – 2250.
174. Walker, S. P. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen / S. P. Walker [et al.] // *BMC pregnancy and childbirth* – 2013. – Vol. 13. – P. 96.
175. Walther-Antônio, M. R. S. Potential contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer / M. R. S. Walther-Antônio [et al.] // *Genome medicine*. – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 122.
176. Wang, J. Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health / J. Wang [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 4191.
177. Wang, L. Role of endometrial blood flow assessment with color Doppler energy in predicting pregnancy outcome of IVF-ET cycles / L. Wang [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2010. – Vol. 8, N 1. – P. 122.
178. Wang, W. Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle / W. Wang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26, N 10. – P. 1644–1653.
179. Welker, B. G. Transvaginal sonography of the endometrium during ovum pickup in stimulated cycles for in vitro fertilization / B. G. Welker [et al.] // *Journal of ultrasound in medicine: official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 1989. – Vol. 8, N 10. – P. 549–553.
180. Winters, A. D. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? / A. D. Winters [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 9905.
181. Wojsiat, J. The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization / J. Wojsiat [et al.] // *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. – 2017. – Vol. 71. – P. 359–366.
182. Yang, B., Wang, Y., Qian, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis / B. Yang, Y. Wang, P. Qian // *BMC bioinformatics*. – 2016. – Vol. 17. – P. 135.

183. Yang, J. Interleukin 6 in follicular fluid reduces embryo fragmentation and improves the clinical pregnancy rate / J. Yang [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2020. – Vol. 37, N 5. – P. 1171–1176.

184. Yasuda, K., Nakanishi, K., Tsutsui, H. Interleukin-18 in health and disease / K. Yasuda, K. Nakanishi, H. Tsutsui // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, N 3. – 649.

185. Yoeli, R. Significance of increased endometrial thickness in assisted reproduction technology treatments / R. Yoeli [et al.] // Journal of assisted reproduction and genetics. – 2004. – Vol. 21, N 8. – P. 285–289.

186. Yoshino, O. Evidence for the expression of interleukin (IL)-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium / O. Yoshino [et al.] // Molecular Human Reproduction. – 2001. – Vol. 7, N 7. – P. 649–654.

187. Yoshino, O. Concentrations of interferon-gamma-induced protein-10 (IP-10), an antiangiogenic substance, are decreased in peritoneal fluid of women with advanced endometriosis / O. Yoshino [et al.] // American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989). – 2003. – Vol. 50, N 1. – P. 60–65.

188. Zanotta, N. Cervico-vaginal secretion cytokine profile: A non-invasive approach to study the endometrial receptivity in IVF cycles / N. Zanotta [et al.] // American Journal of Reproductive Immunology. – 2019. – Vol. 81, N 1. – e13064.

189. Zhu, J. Does IVF cleavage stage embryo quality affect pregnancy complications and neonatal outcomes in singleton gestations after double embryo transfers? / J. Zhu [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2014. – Vol. 31, N 12. – P. 1635–1641.

Список иллюстративного материала

Рисунок 1 — Биологические субстраты доступные для малоинвазивного изучения РЭ.....	15
Рисунок 2 – Сравнение α -разнообразия микробиоты влагалища, шейки матки и эндометрия.....	51
Рисунок 3 – Тепловая карта анализа микробиоты и вирусов на этапе 1 исследования.....	52
Рисунок 4 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов на этапе 1 исследования.....	54
Рисунок 5 – Тепловая карта для цитокинового профилирования менструальной крови.....	56
Рисунок 6 – ROC-кривая оценки РЭ для уровней IP-10 и MIG в менструальном супернатанте.....	57
Рисунок 7 – Матрица корреляции для уровней 48 иммунных медиаторов в менструальном супернатанте.....	58
Рисунок 8 – Сравнение уровней IP-10 и SCGF- β у пациенток с эндометриозом и без данного диагноза.....	59
Рисунок 9 – Сравнение уровней IL-10 и MIG у пациенток со сниженным и несниженным овариальными резервами.....	59
Рисунок 10 – Сравнение уровней общей бактериальной ДНК и индексов α -разнообразия Шеннона между биоматериалом из эндометрия, собранным на первом и втором этапе исследования.....	62
Рисунок 11 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов между аспиратом из эндометрия и менструальной кровью.....	63
Рисунок 12 – Тепловая карта анализа микробиоты и вирусов в менструальной крови.....	64

Рисунок 13 – Сравнение частоты выявления представителей микробиоты и вирусов между аспирином из эндометрия и менструальной кровью.....65

Рисунок 14 – Сравнение обсемененности и индексов α -разнообразия микробиоты Шеннона в группах «беременность наступила» и «беременность не наступила».....66

Рисунок 15 – Сравнение индексов α -разнообразия микробиоты Шеннона у пациенток с наличием и отсутствием снижения овариального резерва.....67

Рисунок 16 – Зависимости уровней цитокинов и обсемененности микроорганизмами или индексов α -разнообразия Шеннона для значимых корреляций.....68

Таблица 1 – Клинико-демографическая характеристика пациенток этапа 1..39

Таблица 2 – Клинико-демографическая характеристика пациенток этапа 2..41

Таблица 3 – Аналитические характеристики примененной технологии мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на магнитных частицах.....45

Таблица 4 – Результаты анализа корреляции уровней гемоглобина и 49 проанализированных иммунных медиаторов в менструальном супернатанте.....60

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Биомаркеры рецептивности в эндометриальной жидкости

Таблица А.1 – Обзор исследований, посвященных анализу одиночных биомаркеров в эндометриальной жидкости

Исследование	ВРТ	Сбор биоматериала	Биомаркер	Порог	Статистический исход*
R. Halperin и соавт., 1995 (n=109)	ЭКО	Смывы (0,1 мл), день ПЭ	hDP 200	>1000 мЕД/мл	Чувствительность 57,14 (28,86–82,34) %; специфичность 69,47 (59,18–78,51) %
N. Lédée-Bataille и соавт., 2004 (n=133)	ЭКО	Смывы (1 мл), день сбора ооцитов	IL-18	>0 пг/мл	Чувствительность 85,71 (71,46–94,57) %; специфичность 35,16 (25,44–45,88) %
D. Gillot и соавт., 2008 (n=31)	Н/Д	Смывы (6 мл), н/д	LRG	Н/Д	Изоформы LRG III и IV повышены у спонтанно забеременевших, p<0,01
P. Florio и соавт., 2008 (n=71)	ВМИ	Смывы (2 мл), день ВМИ	Урокортин	>0,321 пг/мл	Чувствительность 60,70 (40,60–78,50) %; специфичность 97,7 (87,7–99,6) %; AUC 0,88 (0,78–0,94)

Продолжение Таблицы А.1

Исследование	ВРТ	Сбор биоматериала	Биомаркер	Порог	Статистический исход*
Р. Florio и соавт., 2010 (n=50)	ВМИ	Смывы (2 мл), день назначения ХГЧ	Активин А	>0,04 нг/мл	Чувствительность 76 (56,6–88,5) %; специфичность 100 (86,7–100) %; AUC 0,93 (0,82–0,98)
U. Bentin-Ley и соавт., 2011 (n=96)	ЭКО	Смывы (1 мл), на ЛГ+1 и ЛГ+7**	Гликоделин	Н/Д	ЛГ+1: AUC 0,58 (0,44–0,72); ЛГ+7: не значимо
* Формат статистического исхода в отношении наступления клинической беременности не унифицирован ввиду существенной гетерогенности рассматриваемых исследований и ограниченности данных, представлены только статистически значимые результаты с 95% доверительным интервалом. ** Дни 1 и 7 после пика ЛГ.					

Таблица А.2 – Обзор исследований, посвященных анализу множественных биомаркеров в эндометриальной жидкости

Исследование	ВРТ	Сбор биоматериала	Биомаркер	Статистический исход*
N. Lédée-Bataille и соавт., 2002 (n=33)	ЭКО или ВМИ	Смывы (1 мл), день ПЭ	LIF, TNF- α	LIF: беременность (0 (0–177) пг/мл) против ненаступления беременности (203 (0–1620) пг/мл)**, p<0,01
C. Boomsma и соавт., 2009 (n=210)	ЭКО/ИКСИ	Прямая аспирация (1-4 мкл), день ПЭ	IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α , IFN- γ , MIF, Eotaxin, IP-10, MCP-1, DN-1, HBEGF, VEGF	IL-1 β /TNF- α : AUC 0,61 (0,52–0,69)
M. Rahiminejad и соавт., 2015 (n=50)	ЭКО	Прямая аспирация (1-4 мкл), день ПЭ	IL-1 β , TNF- α , IP-10, MCP-1	TNF- α : 13,5 (10,3; 230,45) против 25,1 (17,9;32,7) пг/мл; MCP-1: 250,5(134,2; 372,5) против 1050,3 (106,3; 1995,6) пг/мл; IP-10: 298,2 (267,6; 407,4) против 634,7(290,7;996,3) пг/мл***; Беременность против ненаступления беременности соответственно, p<0,01

Продолжение Таблицы А.2

Исследование	ВРТ	Сбор биоматериала	Биомаркер	Статистический исход*
М. Rahiminejad и соавт., 2016 (n=100)	ЭКО	Прямая аспирация (1-4 мкл), день ПЭ	СОД, КАТ, ПОЛ, ОТГ, ОАС	КАТ: AUC 0,77(0,66–0,87); ОАС: AUC 0,79 (0,69–0,89); СОД: AUC 0,71 (0,60–0,82)
N. Khadem и соавт., 2019 (n=76)	ЭКО	Смывы (2-3 мл), день ПЭ	IL-1 β , TNF- α	Не значимо
* Формат статистического исхода в отношении наступления клинической беременности не унифицирован ввиду существенной гетерогенности рассматриваемых исследований и ограниченности данных, представлены только статистически значимые результаты с 95% доверительным интервалом. ** Медиана (разброс). *** Медиана (интерквартильный размах).				

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Обсемененность репродуктивного тракта микроорганизмами

Таблица Б.1 – Результаты количественного сравнения обсемененности микроорганизмами влагалища, шейки матки и эндометрия на этапе 1 исследования

Таксоны	Обсемененность, %			p-значение		
	В	Ц	Э	Э–В	Э–Ц	Ц–В
<i>Lactobacillus</i> spp.	100 (8–100)	100 (4–100)	100 (13–100)	>0,05	>0,05	>0,05
Enterobacteriaceae	0,04 (0,001–63,1)	0,08 (0,001–100)	Н/Д	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Streptococcus</i> spp.	42,87 (6,3–79,4)	28,2 (6,3–50,1)	29,9 (20,0–39,8)	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,016 (0,001–3,162)	0,016 (0,001–3,98)	Н/Д	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas</i> spp.	35,7 (0,0126–100)	35,7 (0,01–100)	45 (0,04–100)	0,03	>0,05	>0,05
<i>Eubacterium</i> spp.	3,98 (0,002–25,12)	6,3 (0,006–39,811)	25,11 (0,04–100)	<0,001*	0,002*	>0,05
<i>Sneathia</i> spp. + <i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp.	27,8 (15,8–39,8)	37,8 (12,6–63,1)	41,5 (20–63)	>0,05	>0,05	>0,05

Продолжение Таблицы Б.1

Таксоны	Обсемененность, %			р-значение		
	В	Ц	Э	Э–В	Э–Ц	Ц–В
<i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp.	7,94 (1,26–15,85)	5,01 (1,26–12,6)	6,3 (3,2–10,0)	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	0,179 (0,001–1,995)	0,18 (0,001–3,981)	12,6	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	0,0199 (0,001–0,631)	0,016 (0,001–1,585)	Н/Д	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	5,01 (3,98–5,01)	5,01 (2,51–7,94)	3,98 (3,16–6,31)	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Atopobium vaginae</i>	5,01 (0,1–50,12)	5,01 (0,63–39,81)	3,16 (1–50,1)	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Candida</i> spp.	0,025 (0,0003–1,9953)	0,126 (0,006–1,585)	5,15 (3,98–6,31)	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,001 (0,0001–0,0631)	0,026 (0,0013–0,0501)	0,251	>0,05	>0,05	>0,05

Продолжение Таблицы Б.1

Таксоны	Обсемененность, %			p-значение		
	В	Ц	Э	Э–В	Э–Ц	Ц–В
<i>Ureaplasma (urealyticum</i> + <i>parvum</i>)	0,159 (0,0004–10)	0,2 (0,004–25,119)	0,631 (0,002–19,95)	<0,001*	0,005*	>0,05
Примечания: - Данные представлены как медиана (разброс) из-за низкой выявляемости ряда микроорганизмов. - В случаях, когда разброс не указан, микроорганизм был выявлен лишь в одном образце. - Значения обсемененности равные 100% являются следствием аналитических ограничений ПЦР-РВ. Подобные результаты следует трактовать как «близко к 100%». - В – влагалище; Ц – цервикальный канал (шейка матки); Э – эндометрий. - В таблице представлены лишь результаты образцов, где был выявлен искомый микроорганизм, чтобы не повторять результаты качественного сравнения (что было бы неизбежно, учитывая крайне низкую частоту выявления ряда таксонов). - Символом «*» обозначены p-значения, значимые после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.						

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

Результаты цитокинового профилирования менструальной крови

Таблица В.1 – Расширенные результаты цитокинового профилирования

Иммунный медиатор	Группа «беременность наступила»	Группа «беременность не наступила»	р-значение	Общая выборка
STACK	6,155 (5,28; 10,369)	7,351 (4,46; 8,978)	0,850	7,020 (5,022; 9,036)
Eotaxin	1,393 (0,918; 2,013)	1,211 (0,69; 1,52)	0,240	1,277 (0,816; 1,693)
Basic FGF	65,353 (18,497; 105,04)	28,84 (9,691; 78,98)	0,230	31,254 (17,711; 81,384)
G-CSF	107,519 (65,197; 360,407)	65,634 (33,137; 184,054)	0,029	93,103 (49,708; 261,326)
GM-CSF	0,683 (0,482; 1,597)	0,719 (0,367; 2,013)	0,830	0,701 (0,372; 1,701)
GRO- α	313,532 (120,206; 817,382)	104,624 (54,064; 660,365)	0,027	205,284 (71,917; 664,030)
HGF	308,767 (170,272; 694,22)	277,272 (77,371; 477,282)	0,356	293,0195 (142,345; 573,614)
IFN- α 2	0,166 (0; 0,532)	0,255 (0; 0,545)	0,969	0,185 (0; 0,535)
IFN- γ	0,72 (0,212; 2,063)	0,317 (0,207; 0,53)	0,120	0,3845 (0,211; 0,916)
IL-1 α	14,879 (2,83; 30,492)	9,359 (5,479; 15,413)	0,426	10,066 (5,303; 26,320)
IL-1 β	2,143 (1,005; 3,862)	1,279 (0,761; 4,043)	0,390	1,285 (0,834; 3,907)
IL-1ra	1378,713 (646,171; 1801,865)	911,501 (566,269; 1352,785)	0,161	1041,721 (608,461; 1714,641)

Продолжение Таблицы В.1

Иммунный медиатор	Группа «беременность наступила»	Группа «беременность не наступила»	р-значение	Общая выборка
IL-2	0,464 (0,301; 0,732)	0,366 (0,187; 0,737)	0,426	0,3975 (0,281; 0,733)
IL-2R α	6,111 (4,168; 9,848)	4,397 (2,674; 6,911)	0,093	4,698 (2,964; 7,575)
IL-3	0,134 (0,078; 0,213)	0,088 (0,033; 0,219)	0,433	0,124 (0,066; 0,214)
IL-4	0,267 (0,148; 0,389)	0,209 (0,128; 0,246)	0,053	0,213 (0,128; 0,306)
IL-5	5,943 (0; 23,153)	4,187 (0; 10,822)	0,263	4,327 (0; 13,453)
IL-6	62,848 (28,498; 233,212)	36,413 (21,085; 61,874)	0,031	42,592 (24,191; 138,207)
IL-7	0,294 (0; 0,713)	0,206 (0,059; 0,404)	0,493	0,254 (0,057; 0,456)
IL-8	520,831 (285,648; 1376,679)	342,185 (179,236; 550,07)	0,060	404,328 (264,036; 812,608)
IL-9	31,385 (10,563; 40,98)	13,786 (8,472; 24,754)	0,037	15,364 (9,773; 35,669)
IL-10	1,357 (1,042; 2,53)	0,954 (0,441; 1,602)	0,073	1,177 (0,599; 2,116)
IL-12 (p70)	0,165 (0,083; 0,276)	0,095 (0,049; 0,201)	0,128	0,123 (0,056; 0,251)
IL-12 (p40)	23,319 (10,863; 44,754)	15,476 (6,307; 29,956)	0,245	20,385 (10,751; 33,999)
IL-13	0,046 (0,014; 0,116)	0,029 (0,02; 0,055)	0,604	0,037 (0,017; 0,065)
IL-15	27,897 (13,482; 53,112)	16,602 (9,502; 25,986)	0,079	19,826 (12,687; 37,928)
IL-16	34,099 (20,335; 80,356)	26,037 (10,457; 43,041)	0,071	27,625 (15,7193; 51,453)
IL-17	1,107 (0,486; 1,469)	0,969 (0,654; 1,653)	0,649	1,064 (0,506; 1,634)
IL-18	4,287 (3,29; 5,338)	3,895 (1,688; 5,383)	0,331	4,179 (1,929; 5,349)

Продолжение Таблицы В.1

Иммунный медиатор	Группа «беременность наступила»	Группа «беременность не наступила»	р-значение	Общая выборка
IP-10	39,098 (21,667; 114,229)	17,695 (11,187; 33,574)	0,004*	26,0065 (15,869; 46,712)
LIF	40,689 (16,101; 49,141)	26,307 (16,277; 33,505)	0,109	27,7535 (16,233; 44,886)
MCP-1	9,302 (4,164; 42,019)	3,851 (2,562; 10,563)	0,027	6,623 (3,417; 15,210)
MCP-3	0,069 (0; 0,18)	0,078 (0; 0,158)	0,837	0,0725 (0; 0,170)
M-CSF	4,782 (3,252; 6,775)	2,57 (1,352; 3,526)	0,012*	3,317 (1,586; 4,971)
MIF	520,779 (380,784; 1655,352)	564,719 (215,705; 978,885)	0,261	542,749 (241,071; 1193,262)
MIG	15,428 (7,753; 31,222)	7,168 (4,318; 10,97)	0,003*	10,345 (4,919; 19,360)
MIP-1 α	2,175 (1,093; 4,191)	1,387 (1,153; 2,855)	0,337	1,95 (1,138; 3,318)
MIP-1 β	41,133 (24,824; 55,916)	26,217 (12,237; 74,974)	0,503	39,852 (16,787; 59,492)
β -NGF	1,146 (0,725; 2,169)	1,005 (0,539; 2,081)	0,640	1,103 (0,680; 2,103)
PDGF-BB	24,33 (17,019; 66,075)	36,107 (18,308; 66,783)	0,695	31,105 (17,986; 66,252)
RANTES	438,391 (317,695; 704,62)	435,46 (270,846; 572,891)	0,536	436,926 (294,749; 594,091)
SCF	3,102 (2,272; 5,966)	2,007 (1,886; 3,413)	0,018*	2,6485 (1,959; 3,804)
SCGF- β	7045,489 (4375,593; 9077,084)	5419,363 (2869,97; 8252,371)	0,120	5845,911 (3313,462; 8297,142)
SDF-1 α	29,952 (20,691; 41,918)	19,93 (11,542; 32,89)	0,039	23,0875 (12,614; 33,897)
TNF- α	7,772 (4,667; 13,895)	6,14 (3,253; 7,022)	0,083	6,252 (4,033; 9,678)
TNF- β	49,755 (16,1; 58,076)	21,796 (12,253; 36,455)	0,031	25,137 (14,621; 53,560)

Продолжение Таблицы В.1

Иммунный медиатор	Группа «беременность наступила»	Группа «беременность не наступила»	р-значение	Общая выборка
TRAIL	8,769 (5,785; 17,507)	4,7 (2,645; 8,433)	0,010*	6,63 (3,111; 11,442)
VEGF	21,837 (5,359; 28,543)	8,522 (5,093; 15,753)	0,067	12,960 (5,293; 22,714)
Примечания: 1. Данные представлены как медиана (интерквартильный размах) в пг на мг белка. 2. Символом «*» обозначены р-значения, значимые после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.				

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Сравнение уровней цитокинов

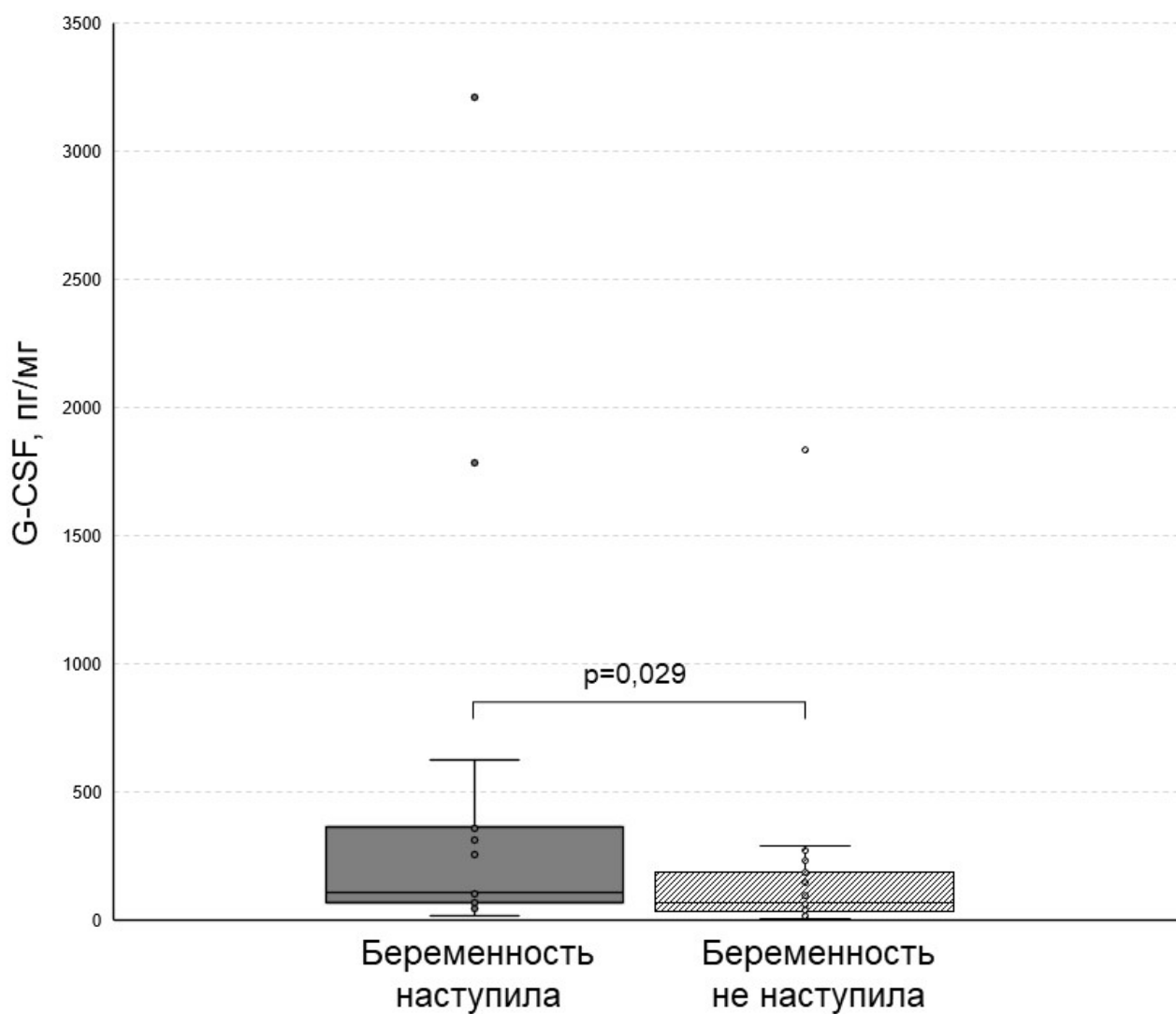


Рисунок Г.1 – Сравнение уровней G-CSF в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

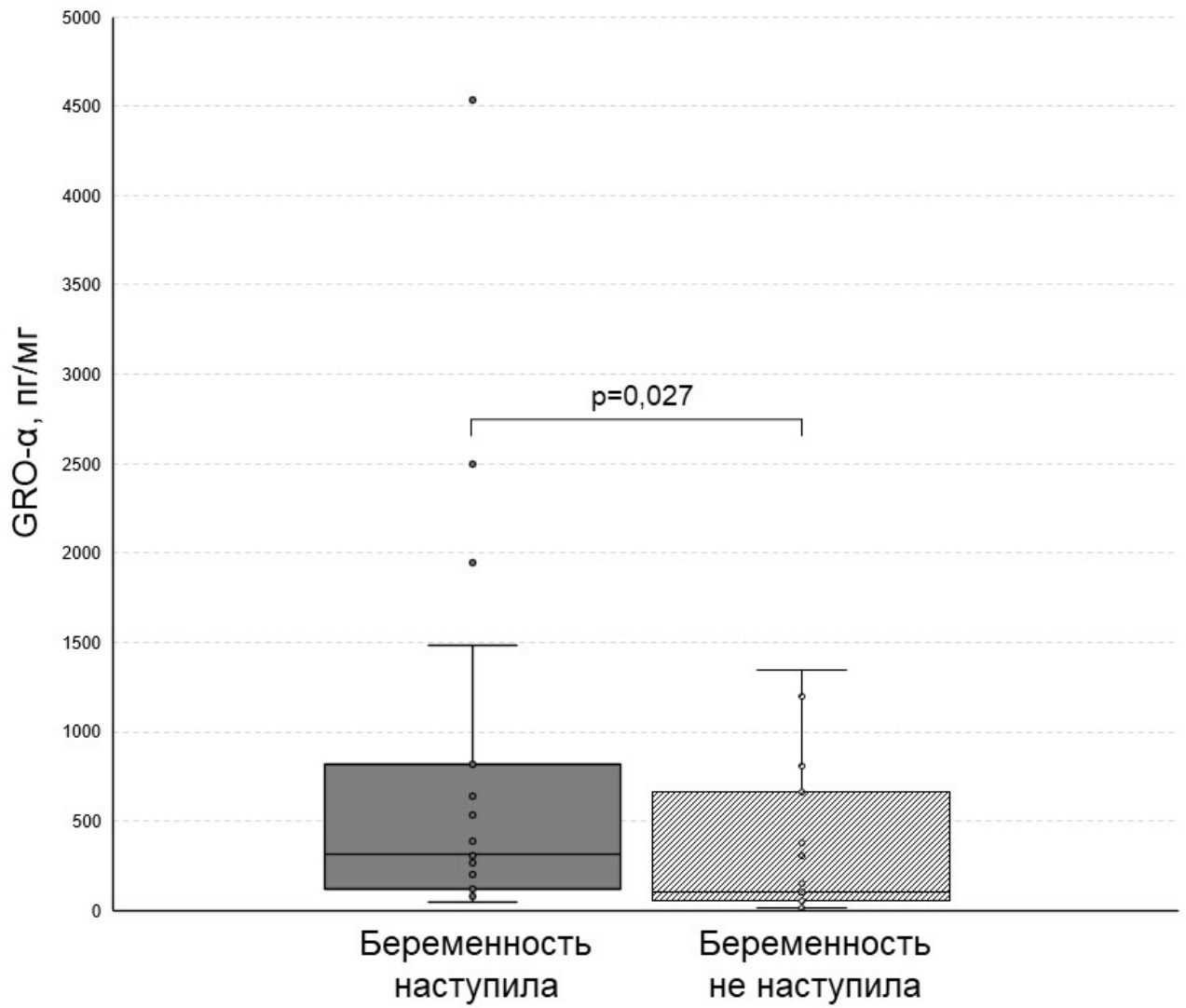


Рисунок Г.2 – Сравнение уровней GRO-α в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

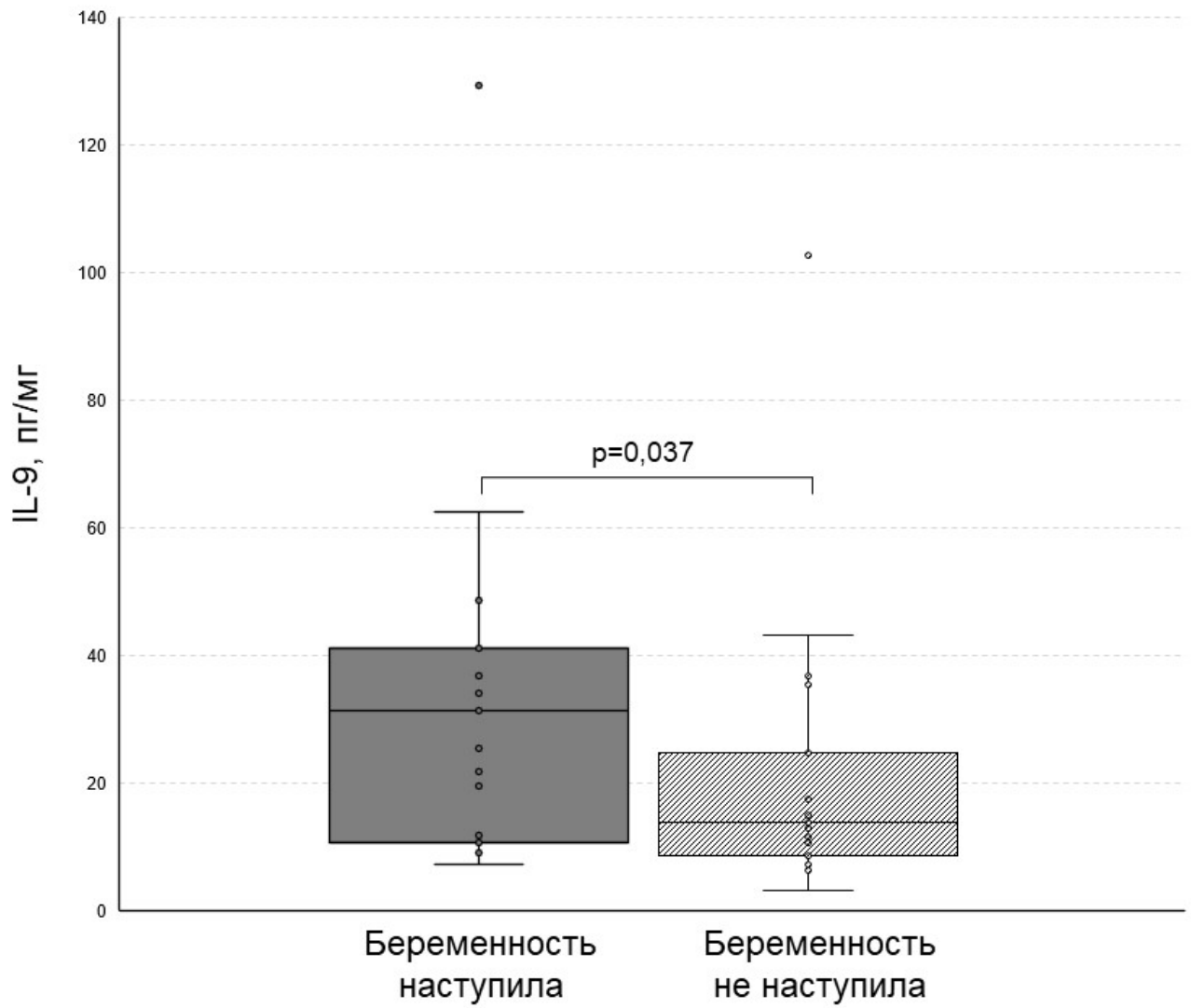


Рисунок Г.3 – Сравнение уровней IL-6 в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

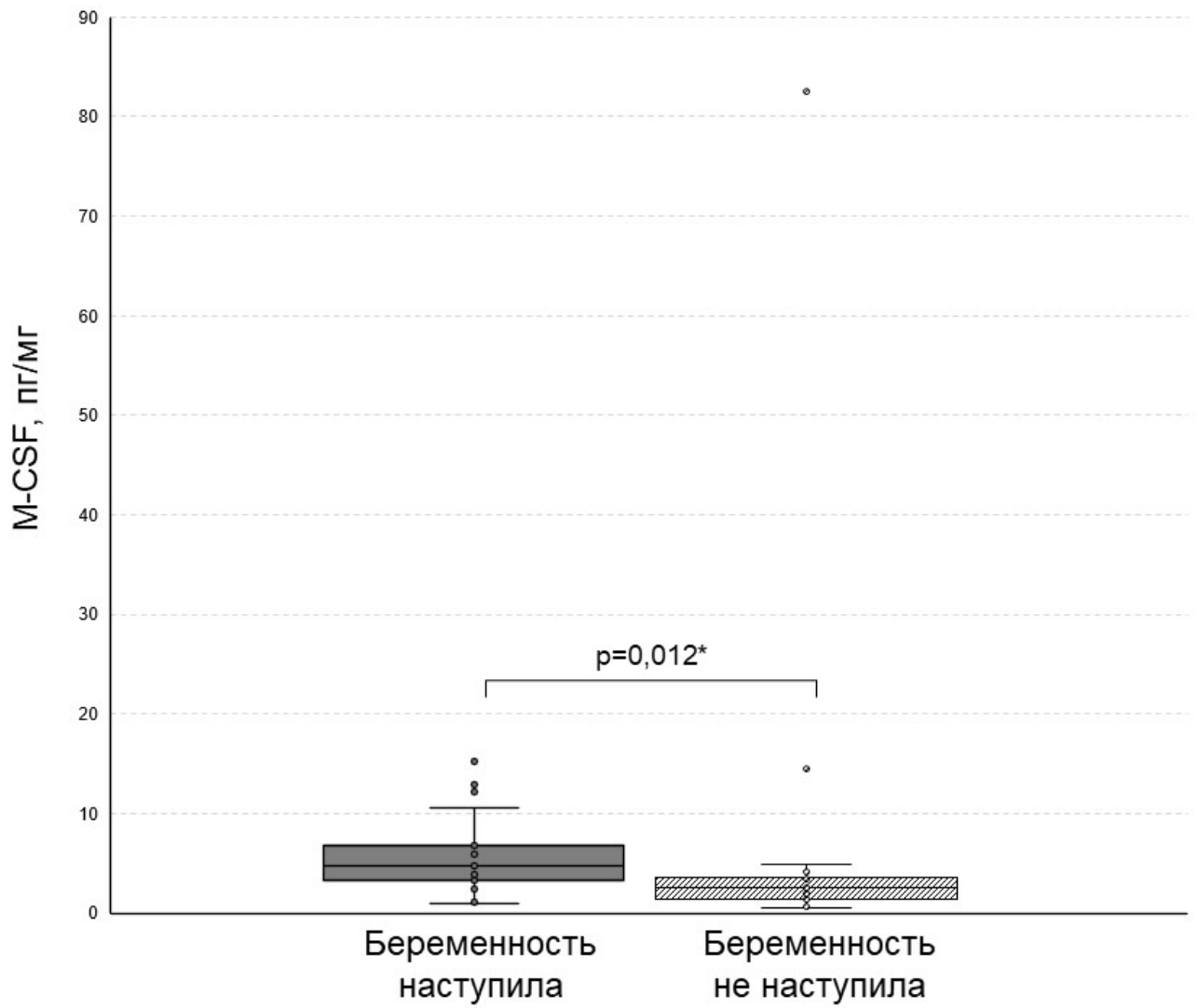


Рисунок Г.4 – Сравнение уровней IL-9 в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

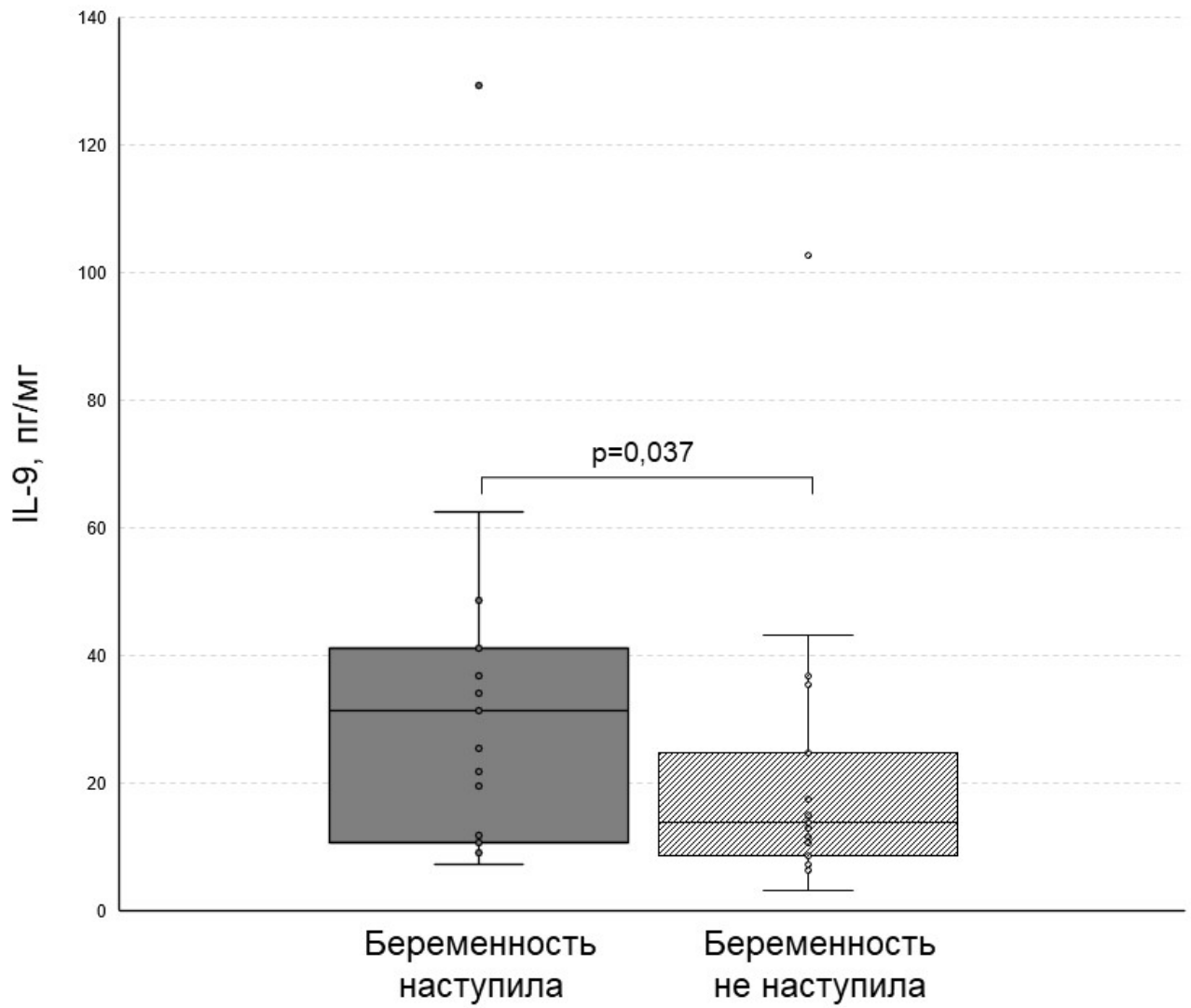
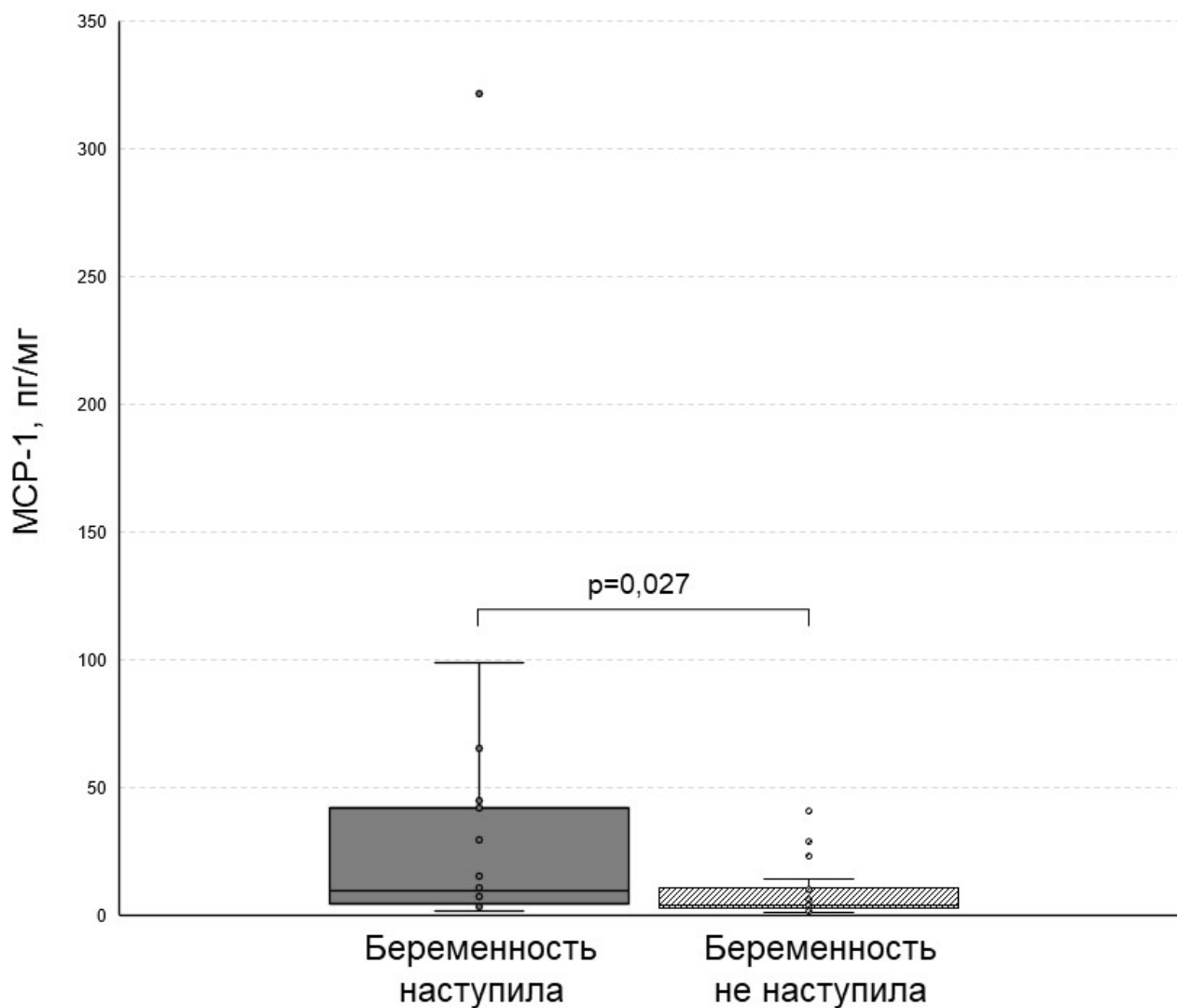


Рисунок Г.5 – Сравнение уровней МСР-1 в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ



Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок Г.6 – Сравнение уровней M-CSF в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

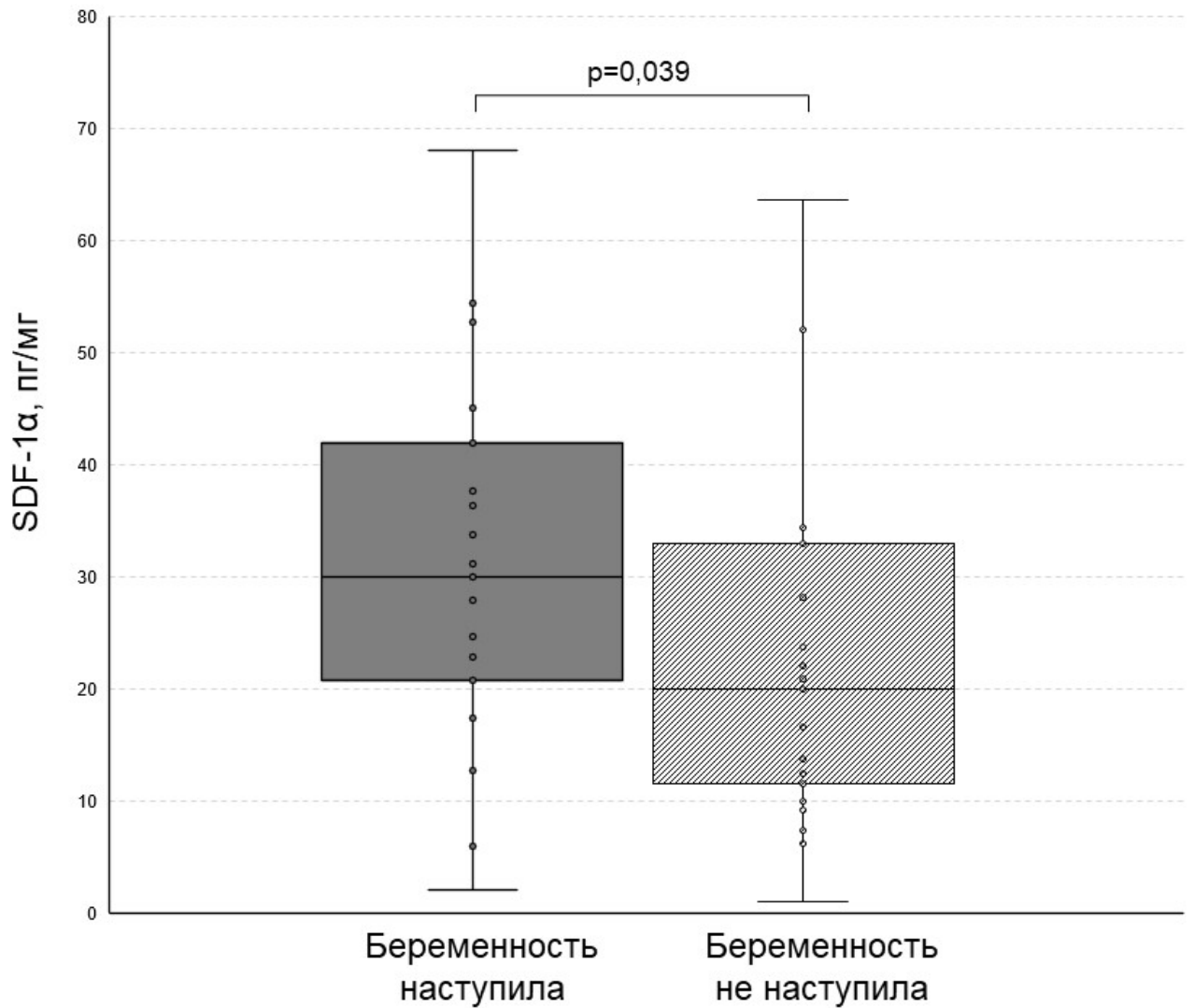


Рисунок Г.7 – Сравнение уровней *SDF-1α* в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

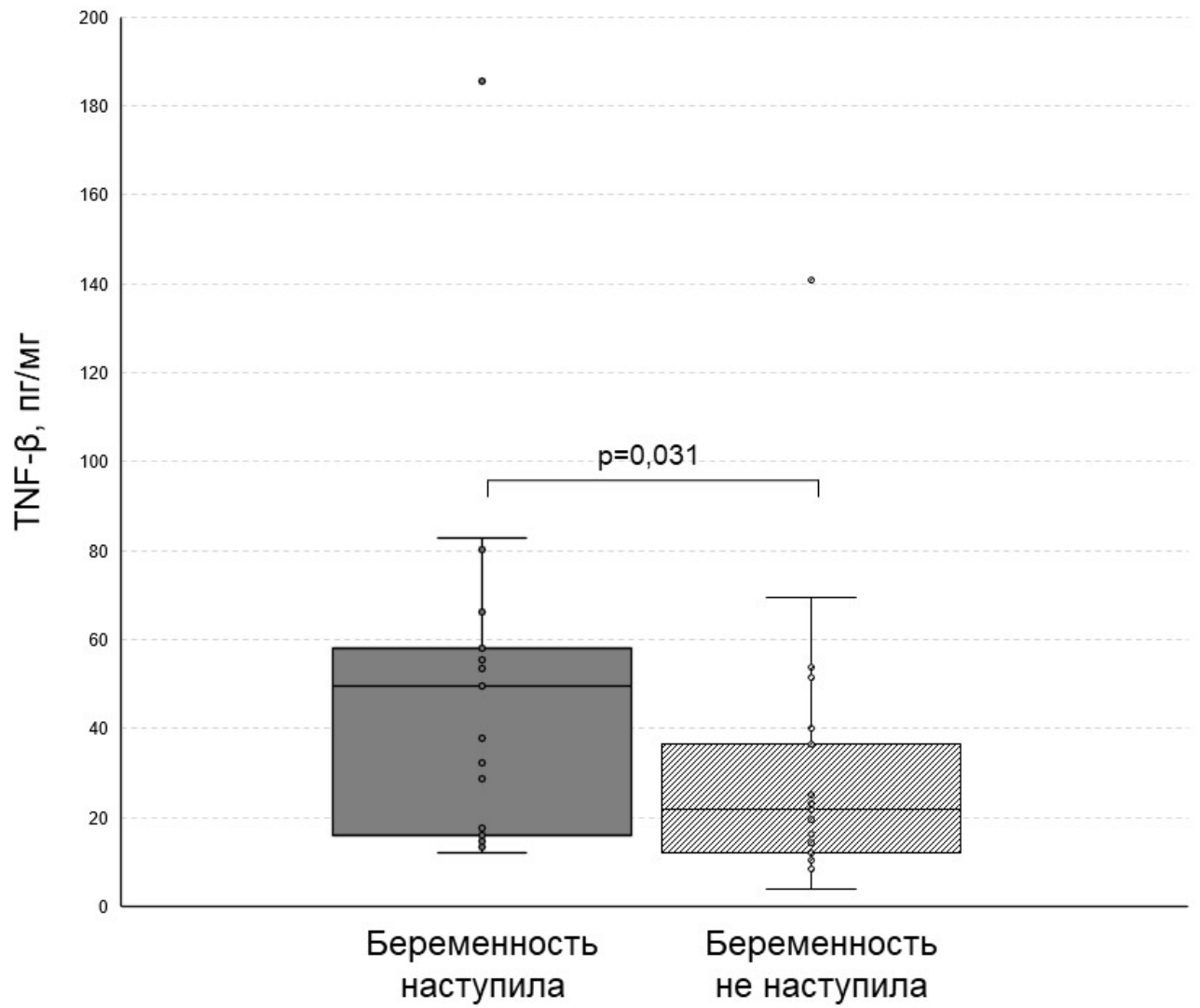
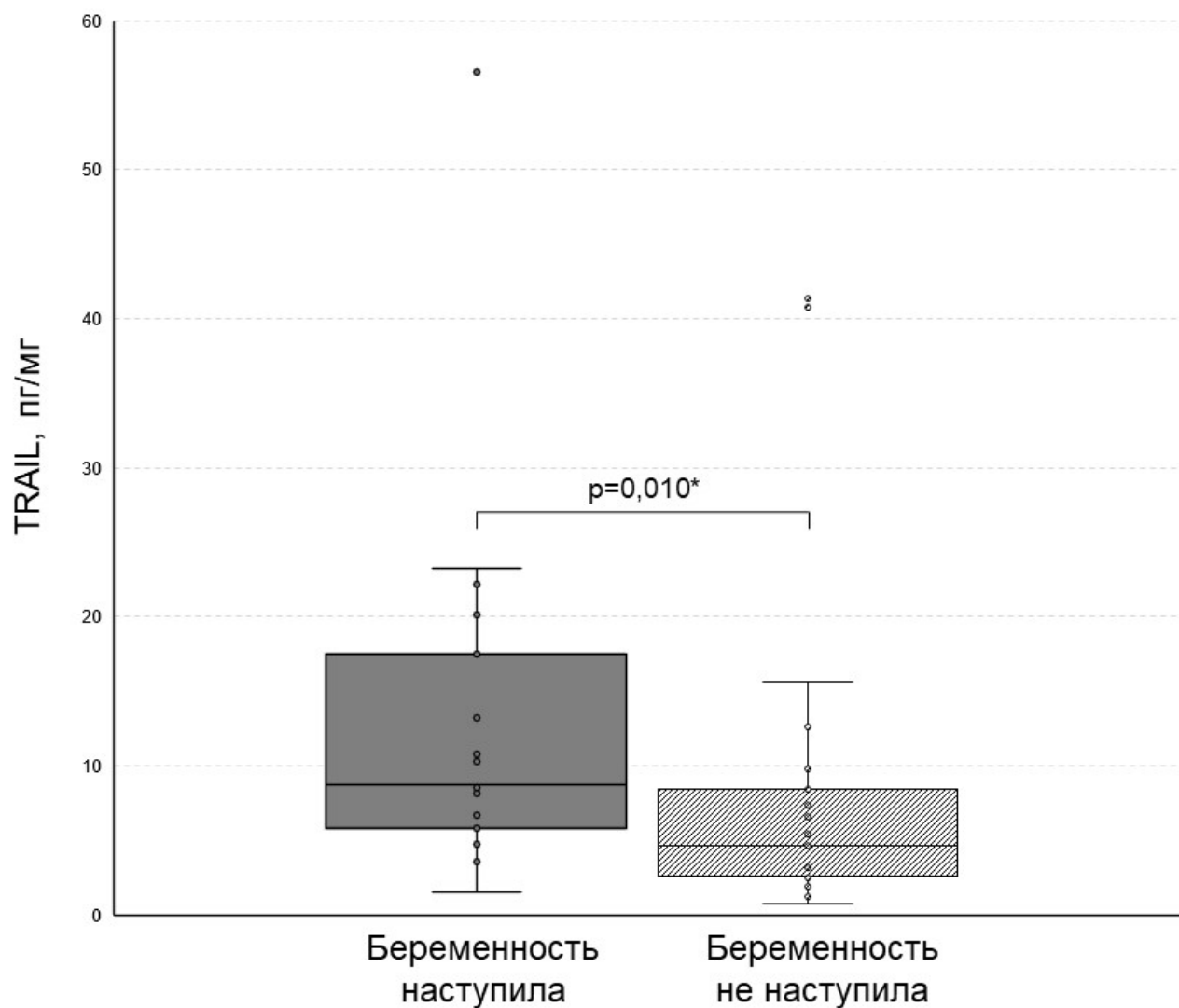
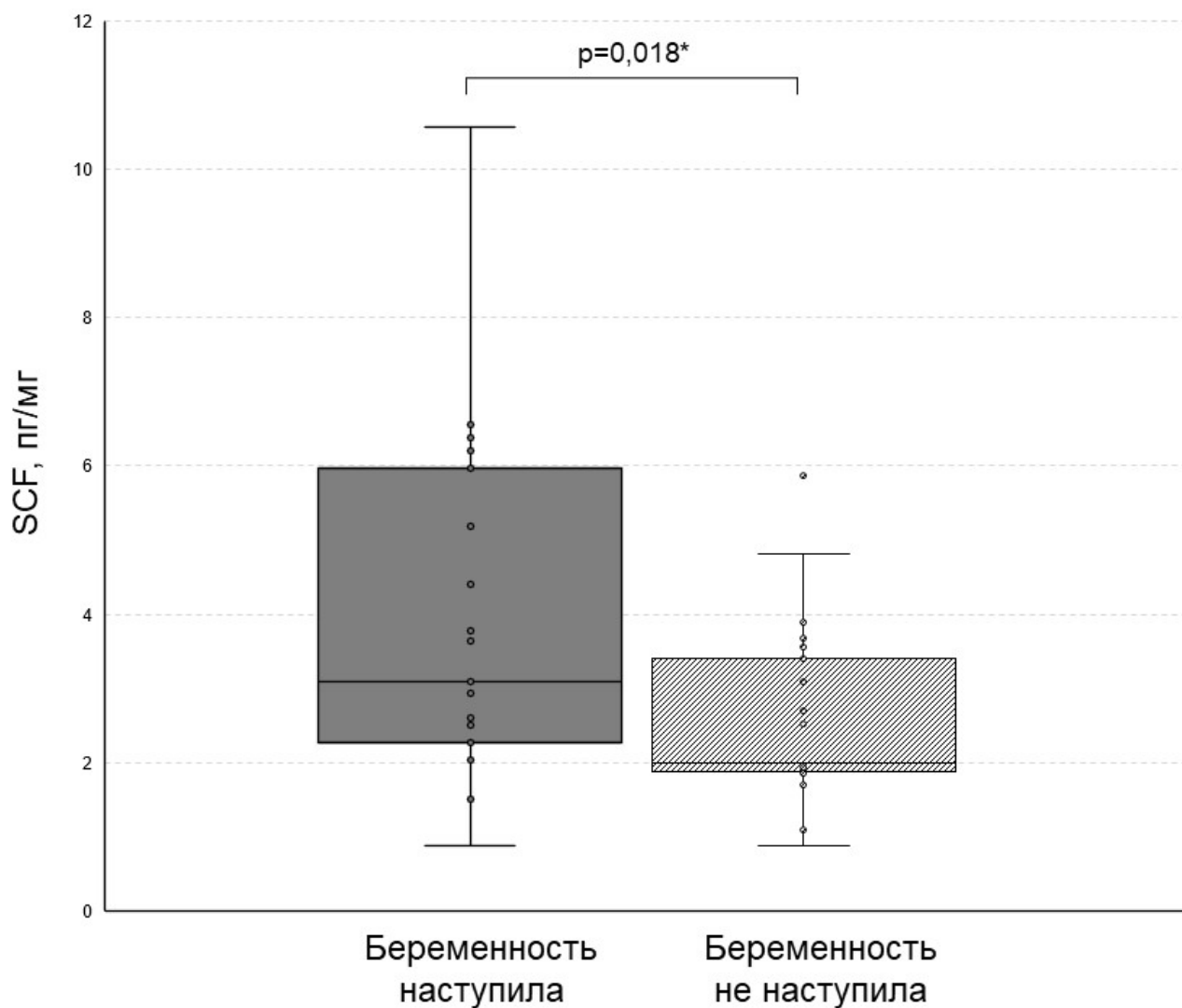


Рисунок Г.8 – Сравнение уровней $TNF-\beta$ в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ



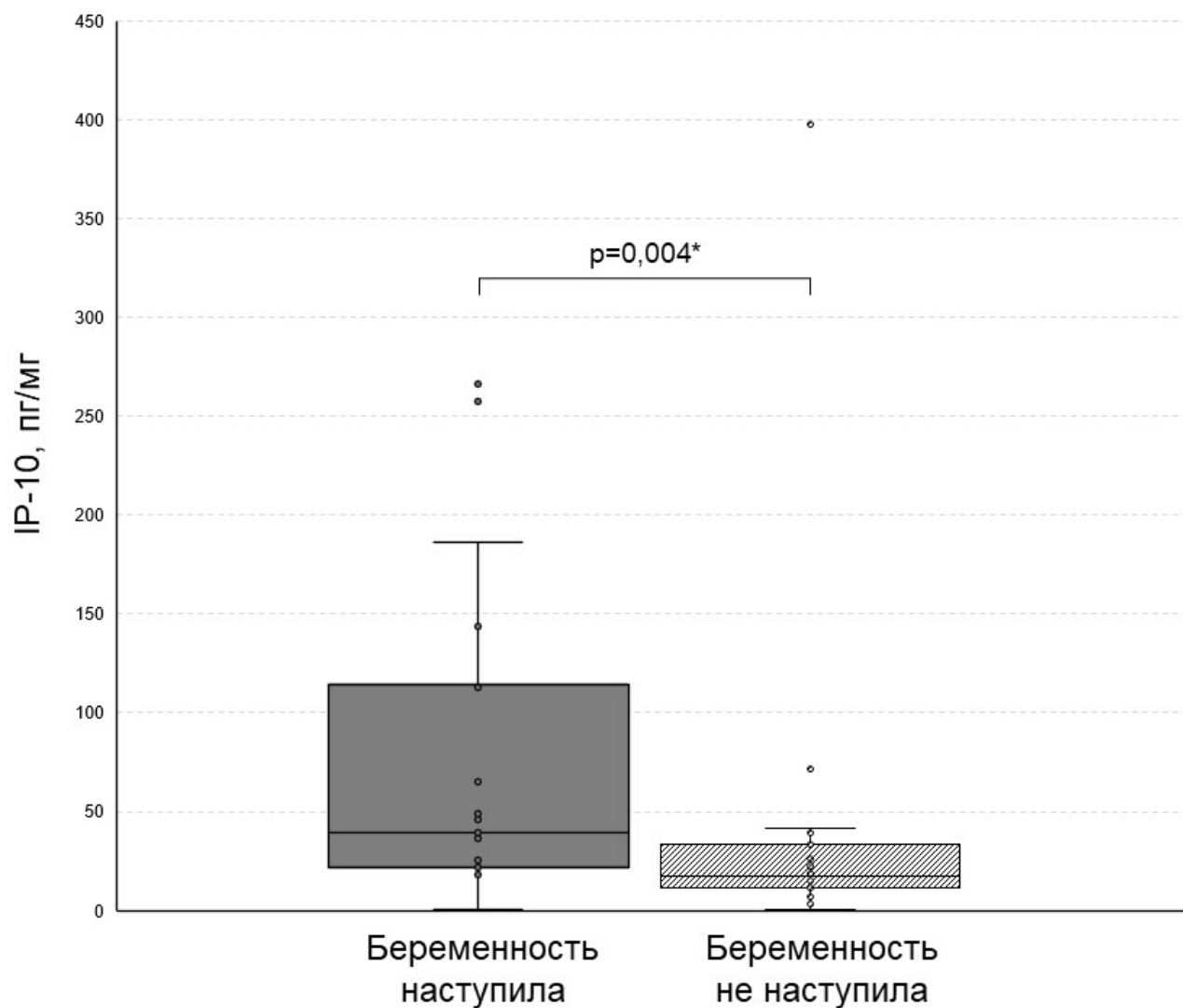
Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок Г.9 – Сравнение уровней TRAIL в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ



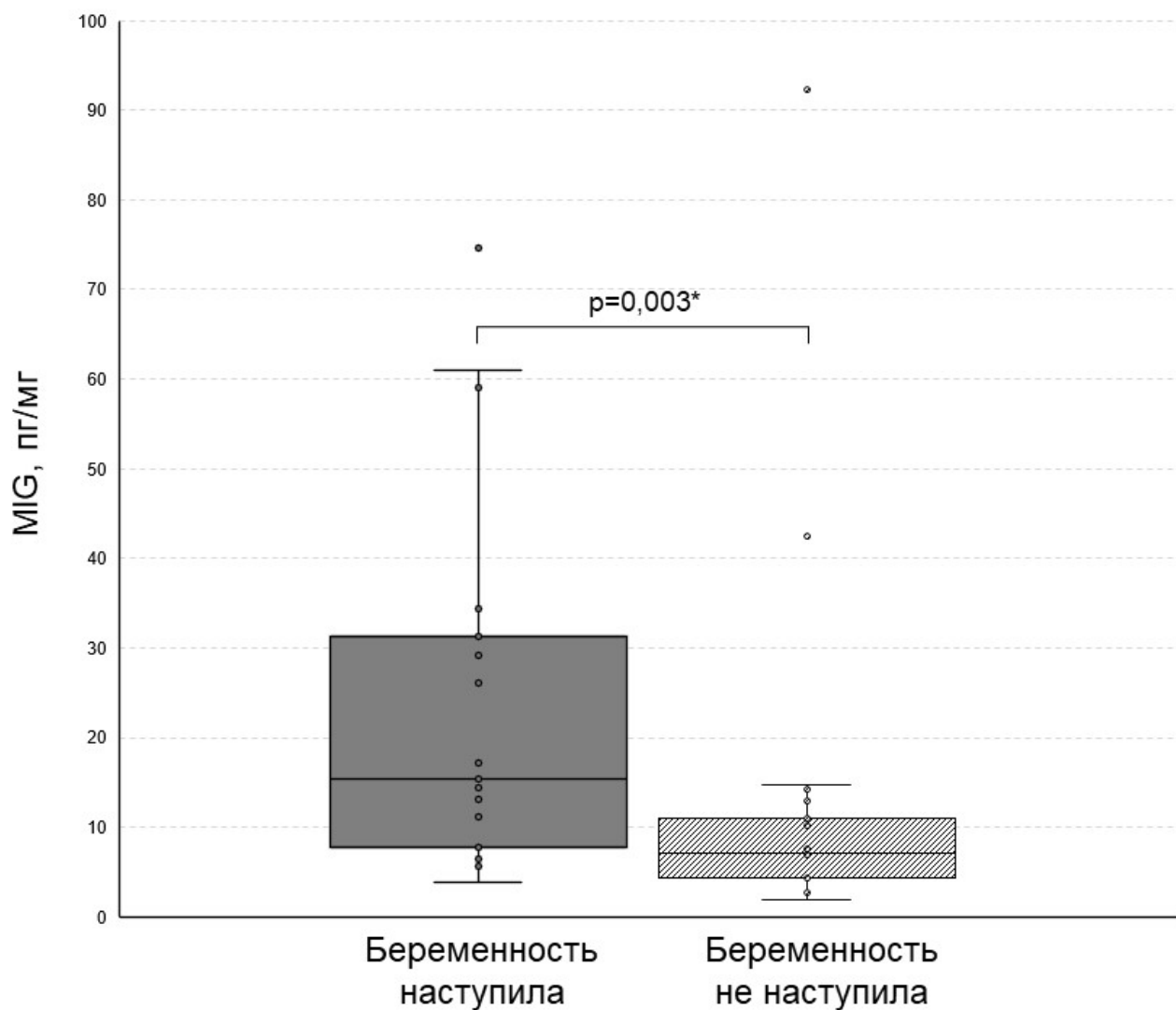
Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок Г.10 – Сравнение уровней SCF в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ



Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок Г.11 – Сравнение уровней IP-10 в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ



Символом «*» обозначено р-значение, значимое после поправки Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Рисунок Г.12 – Сравнение уровней IP-10 в менструальном супернатанте пациенток, достигших и не достигших беременности в результате крио-ПЭ

Благодарности

Данная работа была реализована благодаря тесному сотрудничеству Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с Институтом репродуктивной медицины «РЕМЕДИ», ставшим клинической площадкой для включения пациенток в исследование. Автор благодарен генеральному директору Института репродуктивной медицины «РЕМЕДИ» Е.С. Младовой и всему коллективу врачей-репродуктологов за активное содействие в выполнении работы и проявленные энтузиазм и профессионализм в решении поставленных задач. Также автор благодарен студентам Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Д.М. Анохину и А.А. Шичаниной за помощь в составлении и ведении электронной клинической базы данных с деперсонифицированной клинико-демографической информацией об участниках исследования, а также сотруднице Отдела лабораторной диагностики Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова К.И. Кирилловой за помощь в проведении экспериментов.

Данное исследование было выполнено в рамках научно-исследовательской работы по теме «Поиск мишеней, создание инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины» в рамках государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.