

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“
КАТЕДРА „КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ,
КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ”



Д-р Светла Огнянова Блажева

**Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота
при жени с репродуктивни неуспехи**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
Докторска програма „Имунология“

Плевен, 2025 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“
КАТЕДРА „КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ,
КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ”

Д-р Светла Огнянова Блажева

**Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота
при жени с репродуктивни неуспехи**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1. Медицина
Докторска програма: „Имунология“

Научни ръководители:

Доц. д-р Емилияна Илиева Конова, д.м.
Проф. д-р Галя Иванова Ганчева, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, д.м.н.
Проф. д-р Искра Петрова Алтънкова, д.м.н.

Плевен, 2025 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология” Медицински университет – Плевен, проведен на 07.04.2025 год. и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 183 страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел, Задачи, Материали и методи, Резултати от собствени проучвания, Дискусия, Обобщени изводи, Заключение и Приноси, Приложения. Илюстриран е с 15 таблици, 21 фигури. Библиографската справка включва 336 източника.

Научното жури е в състав назначен със Заповед № 1222/30.04.2025 г. на Ректора на МУ – Плевен:

Вътрешни членове за МУ – Плевен:

доц. д-р Румен Георгиев Русев, д.м.

доц. д-р Цветан Христофоров Луканов, д.м.

- резервен вътрешен член:

доц. д-р Никола Калинов Поповски, д.м.

Външни членове за МУ – Плевен:

проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, д.м.н.

проф. д-р Искра Петрова Алтънкова, д.м.н.

проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, д.м.

- резервен външен член:

проф. д-р Снежина Михайлова Кандиларова, д.м.н.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (<http://www.mu-pleven.bg>).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 09.06.2025 год. от 13:30 ч., в зала Луи Пастър на Медицински университет – Плевен.

Най-често използвани съкращения

На български език

APT	Асистирані репродуктивни техники
ЕМ	Ендометриална микробиота

На латиница

ASRM	Американско дружество по репродуктивна медицина
BCL6	B-cell lymphoma 6
CBir1	Cytoplasmic Carnitine Acetyltransferase 1
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CD	Cluster of differentiation
CXCR5	Chemokine Receptor Type 5
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
ESHRE	Европейското дружество по човешка репродукция и ембриология
EPS	Екстрацелуларна полимерна субстанция
EVT	Extravillous trophoblasts
ERA	Endometrial Receptivity Array
FSH	Follicle-stimulating hormone
GATA3	GATA binding protein 3
hCG	Human chorionic gonadotropin
HLA	Human leukocyte antigen
ICOS	Inducible co-stimulator of lymphocytes
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection,
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cells
IUI	Intrauterine Insemination.
IVF	In vitro fertilization
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LH	Luteinizing hormone
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NLRP3	Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Orm2	Ornithine decarboxylase antizyme 2

pbNK	Peripheral blood natural killer cells
PDGF	Platelet-derived growth factor
PRR	Pattern recognition receptor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
RIF	Recurrent implantation failure
RPL	Recurrent pregnancy loss
SAA3	Serum Amyloid A3 protein
SCT	Stem cell transplant
SCT	Stem cell transplant
SIGNR1	SIGNR1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tfh	T follicular helper cells
TLR	Toll-like receptor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
uNK	Uterine natural killer cells
VEGF	Vascular endothelial growth factor
EVT	Extravillous trophoblasts
M1/M2	Macrophage type 1/ Macrophage type 2

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Въведение.....	8
II.	Цел на дисертационния труд	9
III.	Задачи.....	9
IV.	Материали и методи	10
1.	Клинична група изследвани пациенти.....	10
1.	Дизайн на проучването.....	10
2.	Етично одобрение и събиране на проби	11
3.	Хомогенизиране на биопсия от ендометриална тъкан.....	12
4.	Изследване на ендометриална микробиота.....	12
5.	Флоуцитометричен анализ на ендометриалните имунни клетки	12
6.	Статистически анализ.....	13
V.	Резултати.....	14
1.	Класификация на ендометриалната микробиота при жени с RIF и RPL ...	14
2.	Възрастово разпределение на изследваните жени в различните групи	15
3.	Разпределение на пациентките с RIF и RPL според степента на нарушение на ЕМ	15
4.	Разпределение на пациентките с RIF и RPL според степента на нарушение на ЕМ	16
5.	Флоуцитометрично изследване на имунните клетки в ендометриум	17
6.	Резултати от корелационен анализ	26
7.	Сравнителен анализ на ендометриалните имунни клетки преди и след проведена антибиотична и пробиотична терапия	36
8.	Раждаемост след първата ART процедура с предварително проведена антибиотична и пробиотична терапия.....	38

9. Алгоритъм за диагностично и терапевтично поведение при жени, планиращи АРТ	39
VI. Дискусия	40
1. Възрастово разпределение на изследваните жени в различните групи	40
2. Обсъждане на резултатите от разпределението на биопсиите по групи на ендометриална микробиота. Връзка между микробиотата и репродуктивното здраве	40
3. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично изследване на имунните клетки в ендометриум от жени с репродуктивни нарушения в групите според нарушението на ЕМ.....	43
4. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично изследване на имунните клетки в ендометриум от жени с репродуктивни нарушения в групите според профила на ЕМ.....	50
5. Обсъждане на корелациите в групите с RIF и RPL	53
6. Обсъждане на корелациите между имунните клетки в четирите групи на ЕМ... ..	54
7. Обсъждане на резултатите от анализа на ендометриалните имунни клетки преди и след проведена антибиотична и пробиотична терапия	54
8. Обсъждане на раждаемостта след първата ART процедура от проведената антибиотична и пробиотична терапия.....	55
VII. Обобщени изводи.....	57
VIII. Приноси.....	58
IX. Приложения.....	59

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Развитието на асистираните репродуктивни технологии (АРТ) през последните десетилетия значително разширява възможностите за лечение на инфертилитет. Въпреки напредъка, честотата на неуспешните имплантации и ранните спонтанни аборти остава висока, което подчертава необходимостта от задълбочено изследване на факторите, влияещи върху ендометриалната рецептивност. Докато качеството на ембрионите е съществено за успеха на имплантацията, нарастващ брой изследвания сочат, че имунологичните и микробиомните характеристики на ендометриума играят ключова роля в този процес.

Концепцията за „ендометриален имунен профил“, предложена от Ledee и сътрудници, подчертава значението на локалната имунна регулация за успешната имплантация. Дисбалансът в цитокиновата мрежа, както и промените в броя и функцията на специфични имунни клетки, могат да доведат до имунен отговор, който е или прекомерно активен и отхвърля ембриона, или недостатъчно ефективен, за да осигури подходяща среда за неговото развитие. Различните механизми на имунна дисфункция могат да бъдат фактори за повтарящи се имплантационни неуспехи и спонтанни загуби на бременност.

Наред с имунологичните аспекти, през последните години нараства интересът към ролята на микробиома в репродуктивната медицина. Ендометриалният микробиом, неговият състав и баланс се разглеждат като потенциален модулатор на ендометриалната рецептивност. Проучванията показват, че разнообразието и стабилността на микробната среда могат да повлияят върху процесите на адхезия, инвазия и развитие на ранната бременност. Хетерогенността на микробиомната общност се анализира чрез параметри като алфа- и бета-разнообразие, което позволява оценка на неговата роля в имплантационния процес.

Въпреки напредъка в разбирането на тези механизми, към момента липсва единен подход за стандартизирана оценка на ендометриалния имунен профил и микробиома в контекста на АРТ. Разработването на интегрирани диагностични методи, комбиниращи имунологични и микробиомни анализи, може да допринесе за създаването на персонализирани терапевтични стратегии за подобряване на успеха на имплантацията. Настоящото изследване цели да допълни съществуващите знания в тази област, като анализира взаимодействието между ендометриалния имунен отговор и микробиома при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи и загуби на бременност.

II. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел на настоящия дисертационен труд е да се определят някои от характеристиките на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при жени с повтаряща се имплантационна недостатъчност (RIF) и повтарящи се загуби на плода (RPL) след АРТ процедури. Чрез изясняване на тяхната роля за репродуктивния успех се цели разработване на диагностични и терапевтични подходи за подобряване на репродуктивните резултати при тези пациентки.

III. ЗАДАЧИ

Във връзка с така поставената цел, бяха определени следните основни задачи:

1. Подбор и групиране на пациентите (жени с RIF и с RPL).
2. Внедряване на метод за определяне на ендометриални левкоцитни популации и субпопулации (общи лимфоцити, неутрофили, макрофаги, Т-лимфоцити, NK-клетки, прогениторни NK-клетки и плазматични клетки) при жени с репродуктивни неуспехи.
3. Изследване на жени с RIF и RPL, претърпели АРТ (IVF, ICSI, IUI), за определяне на ендометриалните имунни клетки по време на имплантационния прозорец в лутеалната фаза.
4. Изследване на жените от двете клинични групи чрез ДНК анализ на ендометриални биопсии за оценка на ендометриалната микробиота.
5. Чрез методите на статистическия анализ, определяне на асоциацията на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при клиничната група жени с RIF и RPL.
6. Проучване значението на микробиотния състав и имунния клетъчен профил при хроничния ендометрит и терапията с антибиотици и пробиотици.
7. Проучване значението на микробиотния състав и имунния клетъчен профил за успешното раждане при жените с RIF и RPL.
8. На базата на направеното проучване, изработване на алгоритъм за диагностично и терапевтично поведение при жени, планиращи АРТ.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. КЛИНИЧНА ГРУПА ИЗСЛЕДВАНИ ПАЦИЕНТИ

Проучването обхваща 107 жени с RIF и 93 жени с RPL, постъпили за диагностично уточняване на инфертилитет и лечение чрез АРТ. Средната възраст на пациентките е 36.26 ± 4.54 години (от 26 до 41 години).

Подборът на пациентите, събирането на ендометриалните биопсии и анализът на ендометриалната микробиота са извършени в Медицински център - Клиничен Институт за Репродуктивна Медицина, „Св. Елисавета“, гр. Плевен. Изследванията са одобрени от Комисията по етика за научни изследвания (КЕНИД) към Медицински университет – Плевен, като всички пациенти подписват информирано съгласие.

Определянето на ендометриалните имунни клетки е осъществено в Лабораторията по Клинична имунология към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ - ЕАД, гр. Плевен. За всички участнички са събрани клинични данни, включващи медицинска и репродуктивна анамнеза. Проби с несъответствия във фазата на менструалния цикъл и серумното ниво на прогестерон са изключени от анализа.

Критерии за включване:

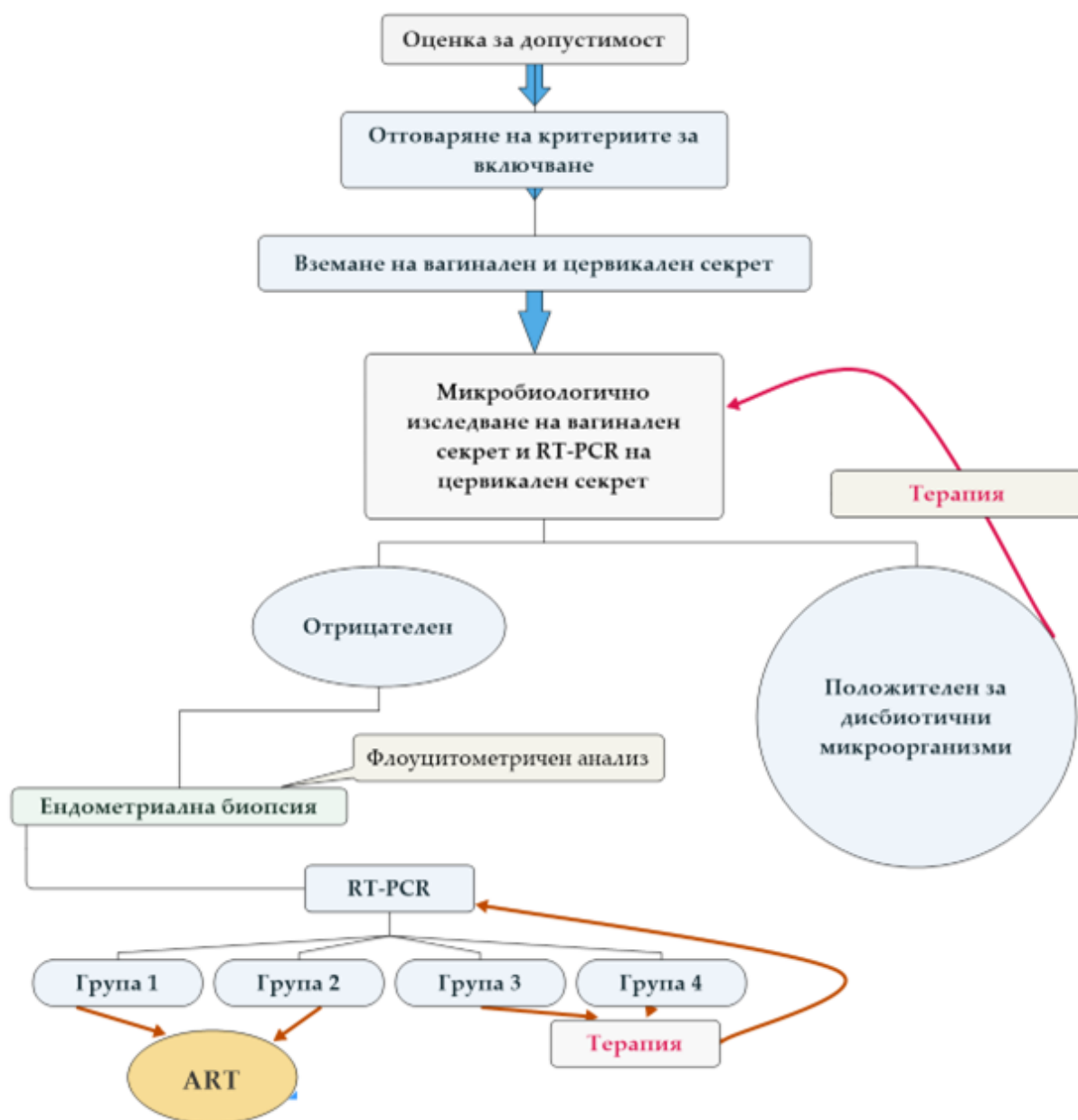
- Индикация за интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (ICSI).
- Най-малко три ембриона с добро качество, трансферирани в поне два цикъла.
- Нормален кариотип на партньорите.
- Съхранен яйчников резерв.
- Нормална форма на маточната кухина.
- Липса на прием на антибиотици един месец преди вземането на пробата.
- За да се избегне замърсяване на ендометриалните проби, е изследван вагинален и цервикален секрет. При наличие на патогени е проведено лечение, а биопсията се извършва след контролни изследвания, доказващи липсата им.
- Наличие на редовен менструален цикъл.

Критерии за изключване:

- Наличие на фактори, допринасящи за неуспешна имплантация и загуба на бременност.

1. ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО

Дизайнът на проучването и последователността на изследванията са представени на Фигура 1.



Фигура 1. Дизайн на проучването.

2. ЕТИЧНО ОДОБРЕНИЕ И СЪБИРАНЕ НА ПРОБИ

Проучването е одобрено от Комисията по етика за научни изследвания към Медицинския университет в Плевен с решение №698-КЕНИД/03.06.2022.

Ендометриални проби се събират по време на средната лутеална фаза (20–22 ден) на естествения менструален цикъл. Вагината и шийката на матката се почистват с 0,9% NaCl. Маточната лигавица се аспирира чрез отрицателно налягане с помощта на стерилен катетър. Пробите се обработват в рамките на 1 час след вземането им. Взетата ендометриална биопсия се поставя в стерилна епруветка с 1 ml стерилна вода. След хомогенизиране, част от получения хомогенат се поставя в транспортна среда. Пробите се съхраняват при температура -20 °C до 1 седмица.

3. ХОМОГЕНИЗИРАНЕ НА БИОПСИЯ ОТ ЕНДОМЕТРИАЛНА ТЪКАН

Ендометриалната биопсия е хомогенизирана с помощта на системата BD™ Medimachine, която включва хомогенизатор, камера и филтър. Тъканта е поставяна в стерилна камера с 1 ml стерилна вода, след което е подлагана на механично раздробяване чрез пулс за 60 секунди. Получената клетъчна суспензия е филтрирана през филтър с размер на порите 50 µm. След филтриране суспензията е центрофугирана и ресуспендирана с PBS, като концентрацията на клетките е регулирана в диапазона от 5×10^5 до 1×10^6 . Всички биологични проби са третирани като потенциално заразни, а отпадъците са изхвърлени в съответствие с местните разпоредби.

4. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕНДОМЕТРИАЛНА МИКРОБИОТА

Използван е PCR, като метод за амплификация на специфични ДНК фрагменти. Основава се на многократно копиране на ДНК с термостабилна ДНК полимераза. Специфичността се определя от комплементарността между праймерите и ДНК матрицата.

Femoflor® 16 REAL-TIME PCR Detection Kit е използван за количествено определяне на микроорганизми в ендометриални биопсии. Китът позволява оценка на обща бактериална маса и специфични микроорганизми. Методът се базира на флуоресцентно маркиране и детекция на PCR продукти. Китът включва контроли за валидиране на процеса.

Изследването е извършено с автоматичен Real time термоциклер (модел). Софтуерът извършва количествен анализ на бактериална ДНК. Взема се предвид количеството човешка ДНК за изключване на фалшиво отрицателни резултати. Използвани са стандартни проби за определяне на относителната концентрация на целевата ДНК.

Геномната ДНК е изолирана с помощта на PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit.

5. ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ НА ЕНДОМЕТРИАЛНИТЕ ИМУННИ КЛЕТКИ

Флоуцитометрията се използва за анализ на клетки, преминаващи през лазерен лъч. Измерват се оптични характеристики като размер, плътност и флуоресценция. Резултатите са представени чрез дот-плотове.

Левкоцитните и лимфоцитни субпопулации са изследвани чрез флоуцитометър FACS Calibur. Използвани са моноклонални антитела, маркирани с флуорохроми, за идентифициране на клетъчни маркери. Анализирани са левкоцити, лимфоцити, макрофаги, неутрофили, uNK-клетки, прогениторни NK-клетки, Т-лимфоцити и плазматични клетки. Данните за левкоцитите са представени като процент от всички ендометриални клетки. Данните за общите лимфоцити, макрофаги и неутрофили са представени като процент от CD45+ клетки. Данните за Т-лимфоцитите, uNK-клетки и прогениторните NK-клетки са представени като процент от лимфоцитите. Данните за

плазматичните клетки са представени като процент от всички ендометриални клетки, като процент от левкоцитите и като процент от лимфоцитите.

Клетъчната суспензия е обработена с моноклонални антитела, лизиращ разтвор и буфер (PBS). Пробите са анализирани чрез флоуцитометър, калибриран с автоматичен софтуер (Cell Quest Pro).

6. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистическият анализ е извършен чрез IBM SPSS софтуер, версия 26 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.) и GraphPad Prism, версия 8.4.3 (GraphPad Software, GraphPad Prism, Version 8.4.3. San Diego, California). Всички параметри са тествани за нормалност на разпределението чрез теста на Shapiro-Wilk W test. Когато нивото на значимост е под 0.05 ($p < 0.05$), нулевата хипотеза за нормално разпределение е отхвърлена, Параметричните данни са анализирани чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Непараметричните данни са анализирани чрез теста на Mann-Whitney U за сравнения по двойки. Данните от сравнението са представени чрез медиана и интерквартилен ранг (IQR). За оценка на корелациите между различните параметри са използвани тестовите на Спирмън и Пийрсън. Изборът на теста е определен от разпределението на данните и спазването на предположенията за нормалност. За сравнение на ендометриалните клетки преди и след проведена терапия е използван тестът на Wilcoxon Signed Rank.

v. РЕЗУЛТАТИ

1. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЕНДОМЕТРИАЛНАТА МИКРОБИОТА ПРИ ЖЕНИ С RIF И RPL

Резултатите, получени чрез молекулярно-генетичното изследване на ендометриалните биопсии от жените с RIF и с RPL дават възможност за формиране на групи по два основни начина:

1.1. Класификация според степента на нарушение на ендометриалната микробиота

Използвана е класификацията, предложена от Iwami Nanako и съавт. (2022 г.), тъй като е полезна и удобна за клиничната практика. Тя предоставя ясна картина за състава на микробиотата, степента на нарушение, необходимостта от лечение или проследяване:

Група А: Нормална микробиота - доминират *Lactobacillus* spp. (над 90%), липсват дисбиотични бактерии.

Група В: Ниска бактериална маса - намалено количество бактерии, включително липса на *Lactobacillus* spp. и дисбиотични бактерии.

Група С: Умерена дисбиоза - намалено количество *Lactobacillus* spp. (под 90%) и повишено количество дисбиотични бактерии (над 10%).

Група D: Тежка дисбиоза - липса на *Lactobacillus* spp. и преобладаващи дисбиотични бактерии (над 10%).

1.2. Класификация според вида на микроорганизмите (микробния профил)

Използвана е класификация според вида на доказаните микроорганизми, което позволява да се изследва връзката между специфичните микроорганизми и ендометриалните имунни клетки.

Група 1: Доминират аеробните микроорганизми.

Група 2: Доминират анаеробните микроорганизми.

Група 3: Наличие както на аеробни, така и на анаеробни микроорганизми.

Група 4: Доминира *Candida* spp.

Група 5: Комбинация от аеробни микроорганизми и *Candida* spp.;

Група 6: Комбинация от анаеробни микроорганизми и *Candida* spp.;

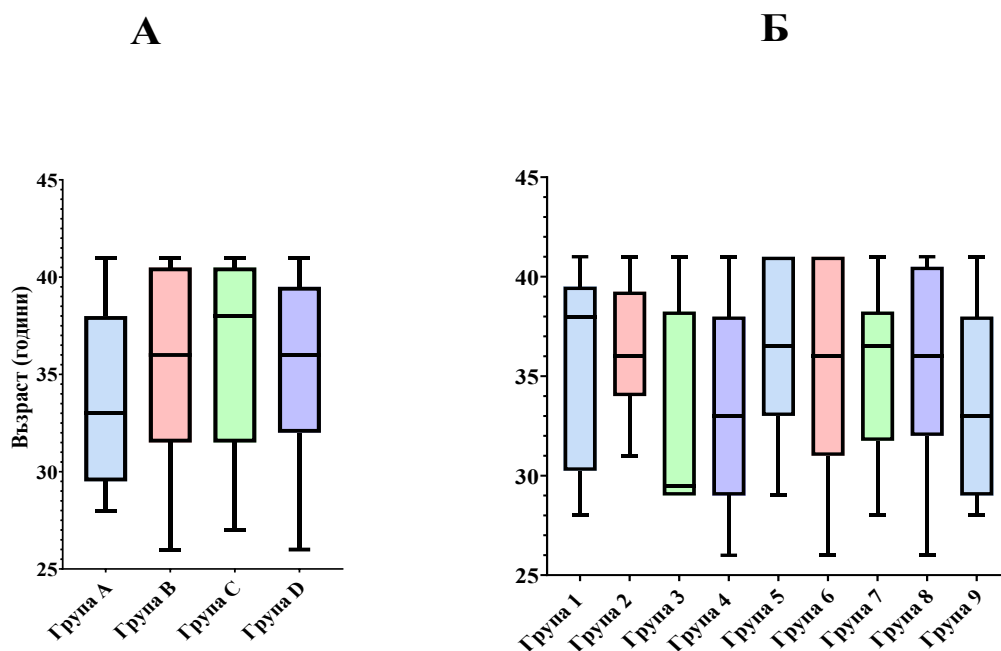
Група 7: Комбинация от аеробни, анаеробни микроорганизми и *Candida* spp.;

Група 8: Липса на *Lactobacillus* spp. и дисбиотични микроорганизми;

Група 9: Преобладаване на *Lactobacillus* spp., над 90%

2. ВЪЗРАСТОВО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЖЕНИ В РАЗЛИЧНИТЕ ГРУПИ

В настоящото проучване са включени 200 жени с репродуктивни неуспехи. Средната възраст на жените е 35.27 ± 4.54 години, от 26 до 41 години. Медианата на възрастта, както и минималната и максималната възраст в групите, категоризирани според вида на нарушение на ендометриалната микробиота и според профила на микроорганизмите са представени на Фигура 2.



Фигура 2. Възрастово разпределение в различните групи, представено чрез медиана, минимум и максимум: А) в групите според нарушението на ЕМ и Б) в групите според микробния профил.

3. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТКИТЕ С RIF И RPL СПОРЕД СТЕПЕНТА НА НАРУШЕНИЕ НА ЕМ

Резултатите от извършения молекулярно-генетичен анализ на изследваните биопсии са представени на Таблица 1. С най-висока честота при жените с RIF и RPL се установява значително нарушена микробиота (Група D). Този вид нарушение се наблюдава в 77 случая (38.5%) от изследваната кохорта. Втората по честота е Група В (28.5%), следвана от Група А (20.5%). Биопсиите от Група С (12.5%) се откриват с най-ниска честота.

Таблица 1. Разпределение на биопсиите ($n = 200$), категоризирани според нарушението на ендометриалната микробиота и според профила на установените микроорганизми при изследваните жени с RIF и RPL.

Групи според микробния състав	Ендометриална микробиота Брой биопсии (%)			
	Група А 41 (20.5)	Група В 57 (28.5)	Група С 25 (12.5)	Група D 77 (38.5)
Група 1	-	-	3 (1.5)	3 (1.5)
Група 2	-	-	3 (1.5)	15 (7.5)
Група 3	-	-	-	4 (2.0)
Група 4	4 (2.0)	8 (4.0)	1 (0.5)	2 (1.0)
Група 5	-	-	1 (0.5)	11 (5.5)
Група 6	-	-	7 (3.5)	26 (13.0)
Група 7	-	-	10 (5.0)	16 (8.0)
Група 8	-	49 (24.5)	-	-
Група 9	37 (18.5)	-	-	-

4. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТКИТЕ С RIF И RPL СПОРЕД СТЕПЕНТА НА НАРУШЕНИЕ НА ЕМ

В Група С (Таблица 1) с най-голяма честота се открива комбинацията от аеробни, анаеробни микроорганизми и *Candida* spp. (при 5.0%, Група 7), следвани от комбинацията на анаеробни микроорганизми и *Candida* spp. (при 3.5 %, Група 6).

В Група D с най-висока честота се открива комбинацията от анаеробни микроорганизми и *Candida* spp. (при 13.0%, Група 6), следвани от комбинацията на аеробни, анаеробни микроорганизми и *Candida* spp. (при 8.0%, Група 7) и анаеробни микроорганизми (при 7.5%, Група 2).

Липсва статистически значима разлика в профила на микроорганизмите между Група С и Група D ($\chi^2(6, n = 102) = 8.757, p = 0.188$).

Данните в Таблица 2 показват нарушенията в ендометриалната микробиота при жените според вида на репродуктивното нарушение, RIF и RPL. Процентът на жените с нарушена и силно нарушена ендометриална микробиота (Група С и Група D) е сходен при жените с RIF (52.34%) и RPL (49.46%). По-висока честота на *Candida* spp., като самостоятелно присъстващ дисбиотичен микроорганизъм (Група 4), се установява в биопсиите от жените с RIF (9.35%) в сравнение с тези от жени с RPL (5.38%).

Таблица 2. Разпределение на биопсиите ($n = 200$) в зависимост от състава на микроорганизмите в маточната микробиота при жените с RIF и RPL.

	n	Аеробни микроорганизми (n)	Анаеробни микроорганизми (n)	Аеробни и анаеробни микроорганизми (n)	<i>Candida</i> spp. (n)	Аеробни микроорганизми и <i>Candida</i> spp. (n)	Анаеробни микроорганизми и <i>Candida</i> spp. (n)	Аеробни, анаеробни микроорганизми и <i>Candida</i> spp. (n)	Родили (n)	Текуща бременност (n)
Група А	22	0	0	0	4	0	0	0	9	2
Група В	29	0	0	0	4	0	0	0	4	3
Група С	15	1	3	0	1	1	5	4	5	1
Група D	41	2	7	2	1	5	17	7	9	7
Общо RIF	107	3	10	2	10	6	22	11	27	13
Група А	19	0	0	0	0	0	0	0	10	1
Група В	28	0	0	0	4	0	0	0	8	5
Група С	10	2	0	0	0	0	2	6	2	1
Група D	36	1	8	2	1	6	9	9	9	4
Общо RPL	93	3	8	2	5	6	11	15	29	11

Разпределението на биопсиите в зависимост от състава на микроорганизмите показва, че при жените с RIF и RPL ендометриална микробиота най-често е значително нарушена. *Candida* spp. се доказва в 86 биопсии.

5. ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИМУННИТЕ КЛЕТКИ В ЕНДОМЕТРИУМ

5.1. Резултати за общата група жени, с RIF и RPL според степента на нарушението на ЕМ

При сравняване стойностите на ендометриалните имунни клетки чрез Kruskal-Wallis H test между четирите изследвани групи се установяват значими разлики в процентните стойности на лимфоцитите ($H(3) = 8.949, p = 0.030$), uNK-клетки ($H(3) = 13.846, p = 0.003$) и Т-лимфоцитите ($H(3) = 12.860, p = 0.005$).

Средните процентни стойности и стандартните отклонения на ендометриалните имунни клетки в четирите групи са представени в таблица 3.

Таблица 3. Ендометриални имунни клетки в различните видове ендометриална микробиота при жените с RIF и RPL. Данните са представени със средна стойност и стандартно отклонение.

	RIF ($\bar{x} \pm SD$)					RPL ($\bar{x} \pm SD$)				
	Група А <i>n</i> = 22	Група В <i>n</i> = 29	Група С <i>n</i> = 15	Група D <i>n</i> = 41	Общо RIF <i>n</i> = 107	Група А <i>n</i> = 19	Група В <i>n</i> = 28	Група С <i>n</i> = 10	Група D <i>n</i> = 36	Общо RPL <i>n</i> = 93
Левкоцити (%)	17.71 ± 10.98	25.09 ± 15.73	23.12 ± 16.33	25.56 ± 15.29	18.26 ± 12.88	19.34 ± 14.99	22.92 ± 13.81	12.13 ± 9.72	16.62 ± 11.04	23.55 ± 14.85
Лимфоцити (%)	43.35 ± 19.64	50.77 ± 18.47	33.68 ± 11.42	44.61 ± 24.75	44.49 ± 21.04	38.94 ± 20.14	45.96 ± 18.77	38.46 ± 24.79	46.96 ± 21.76	44.11 ± 20.89
Макрофаги (%)	31.60 ± 19.67	31.22 ± 18.86	36.32 ± 22.01	32.74 ± 21.96	32.6 ± 20.48	42.61 ± 27.17	26.72 ± 14.5	29.59 ± 24.63	27.89 ± 17.72	30.72 ± 20.55
Неутрофили (%)	21.14 ± 9.74	17.78 ± 2.45	29.75 ± 15.98	22.02 ± 19.84	21.77 ± 17.72	17.30 ± 16.73	25.14 ± 18.69	31.12 ± 27.22	24.58 ± 19.72	23.97 ± 19.82
Т-лимфоцити (%)	34.28 ± 14.85	44.63 ± 15.2	26.86 ± 15.95	35.03 ± 18.09	36.33 ± 17.17	34.69 ± 18.54	40.27 ± 16.98	33.41 ± 20.39	34.18 ± 17.46	36.03 ± 17.79
uNK-клетки (%)	27.93 ± 12.44	23.93 ± 10.69	16.87 ± 9.81	26.78 ± 13.99	24.85 ± 12.65	23.08 ± 12.04	25.44 ± 13.74	17 ± 6.19	28.29 ± 15.98	25.15 ± 14.02
CD34+ uNK-клетки (%)	3.63 ± 4.14	2.41 ± 3.23	1.22 ± 2.18	2.1 ± 2.49	2.37 ± 3.11	2.44 ± 3.52	2.46 ± 3.51	2.07 ± 1.59	1.98 ± 2.35	2.23 ± 2.91
Плазматични клетки ** (%)	2.70 ± 4.03	3.46 ± 6.48	6.31 ± 10.57	2.26 ± 5.38	3.24 ± 6.46	2.2 ± 2.44	1.18 ± 1.52	2.18 ± 5.39	2.12 ± 2.9	1.86 ± 2.84
Плазматични клетки * (%)	0.64 ± 1.2	0.59 ± 1.19	0.92 ± 2.07	0.56 ± 1.93	0.64 ± 1.62	0.39 ± 0.51	0.29 ± 0.54	0.8 ± 2.04	0.53 ± 0.77	0.46 ± 0.89

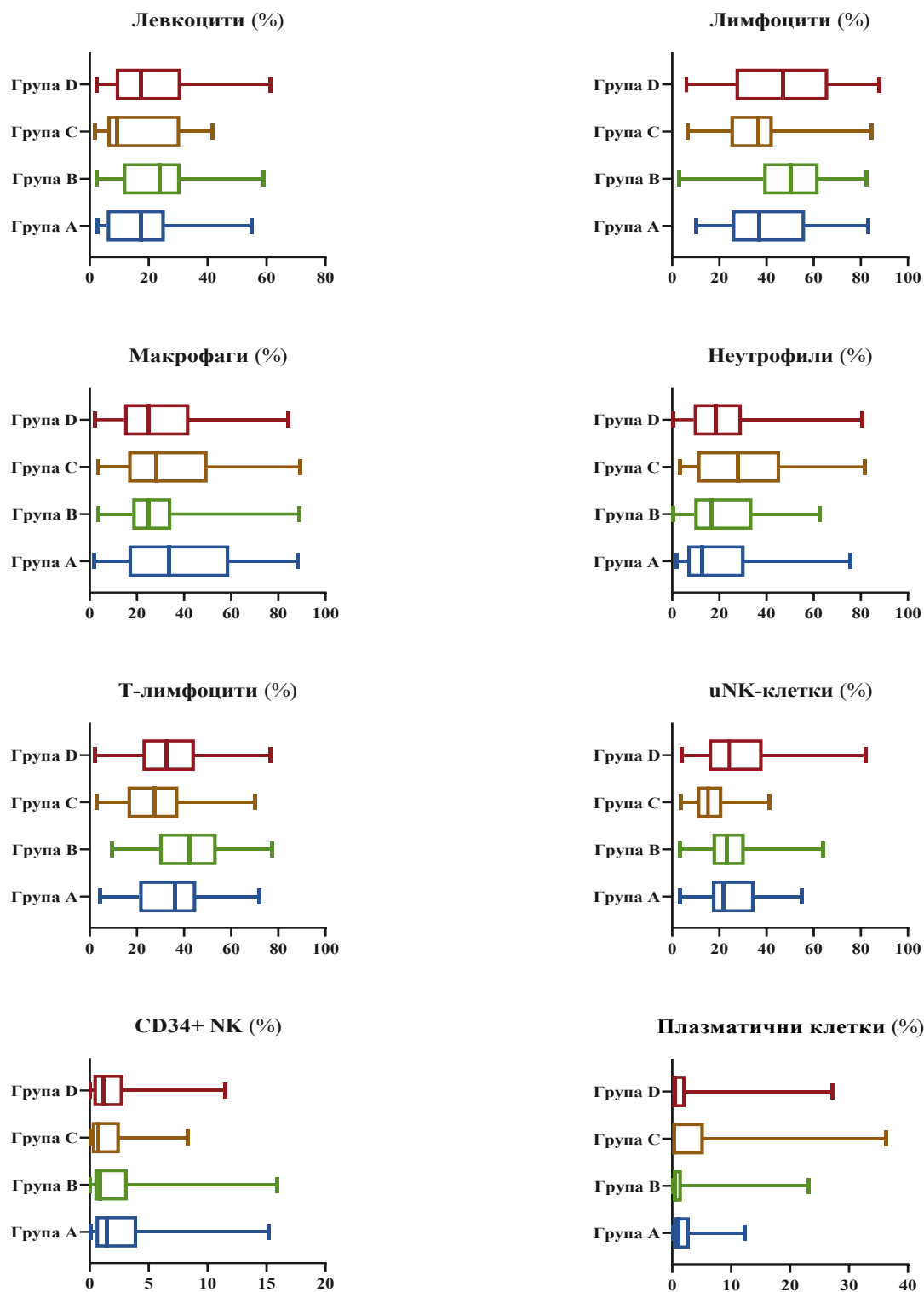
Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки).

Резултатите от анализа на ендометриалните имунни клетки чрез Mann-Whitney U test, които имат статистическа значимост са представени в таблица 4 и на фигура 3.

Таблица 4. Сравнение на средните процентни стойности на ендометриалните имунни клетки между четирите групи на ЕМ (n = 200) чрез Mann-Whitney U test. Данните от сравнението са представени чрез медиана и интерквартилен ранг (IQR).

Ендометриални имунни клетки	Групи	Медиана	IQR	<i>U</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
Левкоцити	B	23.79	19.58	484.0	57	-2.302	0.021
	C	9.16	24.79		25		
Лимфоцити	B	50.14	23.44	401.0	57	-3.138	0.002
	C	36.72	17.95		25		
	C	36.72	17.95	702.0	25	-2.027	0.043
	D	47.08	39.30		77		
Неутрофили	A	12.59	24.35	323.0	41	-2.505	0.012
	C	27.89	35.21		25		
Т-лимфоцити	A	36.12	24.23	852.5	41	-2.276	0.023
	B	42.25	24.43		57		
	B	42.25	24.43	403.0	57	-3.118	0.002
	C	27.48	21.64		25		
	B	42.25	24.43	1595.5	57	-2.696	0.007
	D	32.70	22.20		77		
uNK-клетки	A	21.80	18.07	269.0	41	-3.219	0.001
	C	15.18	10.89		25		
	B	23.15	13.64	405.0	57	-3.097	0.002
	C	15.18	10.89		25		
	C	15.18	10.89	527.0	25	-3.388	0.001
	D	24.19	22.91		77		
CD34+ uNK	A	1.47	3.55	359.5	41	-2.023	0.043
	C	0.71	2.39		25		
Плазматични клетки*	A	0.13	0.56	895.5	41	-1.972	0.049
	B	0.08	0.48		57		

Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки).



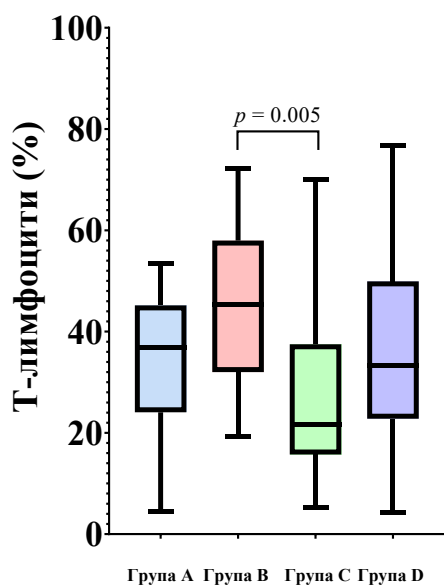
Фигура 3. Сравнение на средните процентни стойности на ендометриалните имунни клетки между четирите групи на ЕМ ($n = 200$) чрез Mann-Whitney U test. Боксовете представляват медианата и интерквартилния диапазон.

В Група С при 11 от 25 изследвани жени се установява, че има по-висок процент на ендометриални неутрофили от средния за групата, но само при една от тези 11 в група

С се наблюдава повишение на плазматичните клетки (7.29% спрямо всички клетки). В Група D, 30 от 77 изследвани пациентки показват по-висок процент на ендометриални неутрофили от средния процент за групата, но само в две от тях има повишени ендометриални плазматични клетки (4.76% и 3.23% спрямо всички клетки).

5.2. Резултати на изследваните жени с RIF в четирите групи, според вида на нарушение на ЕМ, чрез флоуцитометричен анализ на ендометриални биопсии

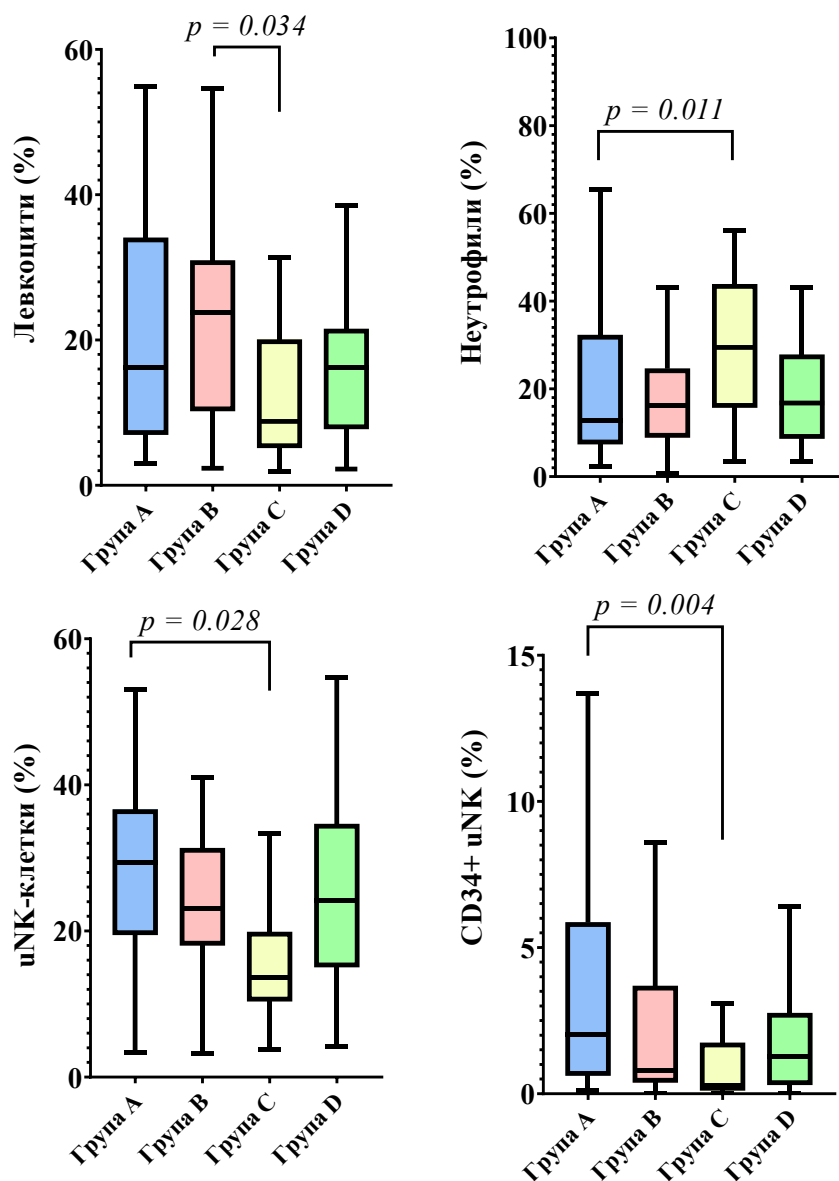
Статистически значима разлика се установява в Т-лимфоцитите между групите според вида на нарушението на ЕМ, $F(3, 103) = 4.336$, $p = .006$. Процентната стойност на Т-лимфоцитите следва нормално разпределение в групата на RIF. Приложен е еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) за сравнение на средните стойности между групите. Допълнителното сравнение между групите с помощта на теста на Tukey HSD показва, че средната процентна стойност на Т-лимфоцитите в Група В ($M = 44.63$, $SD = 15.20$) е значително по-висока от тази на Група С ($M = 26.86$, $SD = 15.95$), $p = 0.005$ (Фигура 4).



Фигура 4. Сравнителен анализ на процентните стойности на ендометриалните Т-лимфоцити между групите според вида на ЕМ при жените с RIF ($n = 107$). Стълбчетата представляват медианата и интерквартилния диапазон.

При проведения анализ на вариацията (Kruskal-Wallis) между четирите групи и ендометриалните клетки, които не отговарят на теста за нормалност на разпределението, се установяват различия ($p < 0.05$) по отношение на левкоцитите $H(3) = 8.26$, $p = 0.041$, неутрофилите $H(3) = 10.03$, $p = 0.018$, uNK-клетки $H(3) = 9.75$, $p = 0.021$ и CD34+ uNK-клетки $H(3) = 8.01$, $p = 0.046$. Различията между групите са анализирани чрез Mann-Whitney U test, в резултат на който се установяват значително по-високи процентни стойности при: левкоцитите в Група В, в сравнение с Група С;

неутрофилите в Група С, в сравнение с Група А; uNK-клетки и CD34+ uNK-клетки в Група А, в сравнение с Група С (Фигура 5).



Фигура 5. Сравнителен анализ на процентните стойности на левкоцити, неутрофили, uNK-клетки и CD34+ uNK-клетки между четирите групи при жените с RIF. Боксовете представляват медианата и интерквartilния диапазон.

5.3. Резултати от флоуцитометрично изследване на биопсии в четирите групи според вида на нарушение на ЕМ при жените с RPL

При жените с RPL нито един от приложените тестове не открива значима разлика в ендометриалните клетки между групите, формирани според нарушението на ЕМ или според микробния профил.

5.4. Резултати от флоуцитометрично изследване на биопсии за общата група жени в групите според профила на ендометриалните микроорганизми

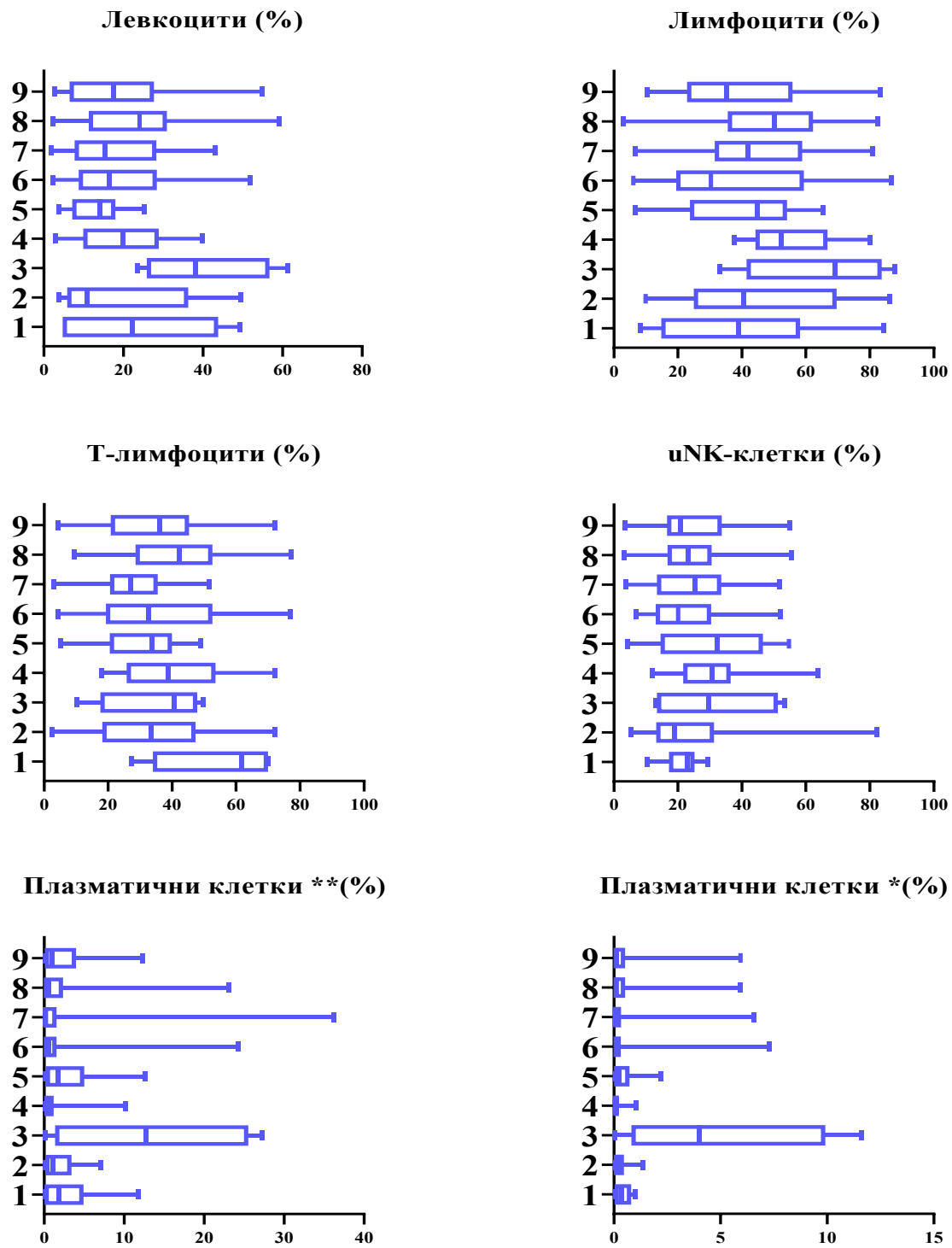
Статистическият анализ на ендометриалните имунни клетки между деветте изследвани групи е представен в Таблица 5 и Фигура 6.

Таблица 5. Сравнение на средните процентни стойности на ендометриалните имунни клетки между различните групи според профила на микроорганизмите ($n = 200$) чрез Mann-Whitney U test. Представени са само групите, при сравнението, на които има статистически значима разлика.

Ендометриални имунни клетки	Групи	Медиана	IQR	<i>U</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>
Левкоцити	2	10.89	30.19	12	$\frac{18}{4}$	-2.043	0.041
	3	38.08	30.61		$\frac{4}{4}$		
	3	38.08	30.61	8	$\frac{4}{15}$	-2.200	0.028
	4	19.94	18.74		$\frac{15}{15}$		
	3	38.08	30.61	1	$\frac{4}{12}$	-2.789	0.005
	5	14.08	10.57		$\frac{12}{12}$		
	3	38.08	30.61	16	$\frac{4}{33}$	-2.446	0.014
	6	16.50	19.43		$\frac{33}{33}$		
	3	38.08	30.61	15	$\frac{4}{26}$	-2.257	0.024
	7	15.41	20.35		$\frac{26}{26}$		
	3	38.08	30.61	21	$\frac{4}{37}$	-2.329	0.020
	9	17.48	20.98		$\frac{37}{37}$		
Лимфоцити	5	14.08	10.57	158	$\frac{12}{49}$	-2.467	0.014
	8	24.04	19.42		$\frac{49}{49}$		
	3	69.15	41.98	7	$\frac{4}{12}$	-2.062	0.039
	5	44.71	30.05		$\frac{12}{12}$		
	3	69.15	41.98	24	$\frac{4}{33}$	-2.054	0.040
	6	30.31	39.66		$\frac{33}{33}$		
	3	69.15	41.98	29	$\frac{4}{37}$	-1.977	0.048
	9	35.90	45.95		$\frac{37}{37}$		
	4	52.39	22.19	48	$\frac{15}{12}$	-2.049	0.040
	5	44.71	30.05		$\frac{12}{12}$		
	4	52.39	22.19	132	$\frac{15}{33}$	-2.569	0.010
	6	30.31	39.66		$\frac{33}{33}$		
Т-лимфоцити	4	52.39	22.19	139	$\frac{15}{37}$	-2.797	0.041
	9	35.90	45.95		$\frac{37}{37}$		
	8	50.14	26.37	674	$\frac{49}{37}$	-2.028	0.028
	9	35.90	45.95		$\frac{37}{37}$		
	1	61.70	35.70	12	$\frac{6}{12}$	-2.248	0.005
	5	33.66	19.16		$\frac{12}{12}$		
	1	61.70	35.70	42	$\frac{6}{33}$	-2.219	0.014
	6	32.54	33.01		$\frac{33}{33}$		
	1	61.70	35.70	20	$\frac{6}{26}$	-2.800	0.024
	7	27.04	14.58		$\frac{26}{26}$		
	1	61.70	35.70	48	$\frac{6}{37}$	-2.208	0.020
	9	36.12	24.23		$\frac{37}{37}$		
	4	38.68	27.48	109	$\frac{15}{26}$	-2.328	0.014
	7	27.04	14.58		$\frac{26}{26}$		

	5	33.66	19.16	176	$\frac{12}{49}$	-2.141	0.039
	8	42.25	23.72				
	7	27.04	14.58	332.5	$\frac{26}{49}$	-3.390	0.040
	8	42.25	23.72				
	8	42.25	23.72	676.5	$\frac{49}{37}$	-2.006	0.048
	9	36.12	24.23				
uNK-клетки	2	18.90	17.82	78	$\frac{18}{15}$	-2.061	0.040
	4	30.67	14.56				
	4	30.67	14.56	141	$\frac{15}{33}$	-2.369	0.010
	6	20.10	17.01				
	4	30.67	14.56	218	$\frac{15}{49}$	-2.369	0.041
	8	23.08	13.52				
Плазматични клетки*	2	0.25	0.42	12	$\frac{18}{4}$	-2.045	0.028
	3	3.99	9.04				
	3	3.99	9.04	25	$\frac{4}{37}$	-2.155	0.048
	9	0.13	0.74				
	3	3.99	9.04	20	$\frac{4}{33}$	-2.261	0.024
	6	0.11	0.30				
	3	3.99	9.04	8	$\frac{4}{15}$	-2.204	0.005
	4	0.06	0.18				
	3	3.99	9.04	13	$\frac{4}{26}$	-2.482	0.014
	7	0.00	0.31				
	3	3.99	9.04	28	$\frac{4}{49}$	-2.375	0.040
	8	0.13	0.51				
	7	0.00	0.31	329.5	$\frac{26}{37}$	-2.140	0.010
	9	0.13	0.74				
Плазматични клетки**	3	12.76	24.04	26	$\frac{4}{33}$	-1.966	0.014
	6	0.62	1.49				
	3	12.76	24.04	17	$\frac{4}{26}$	-2.227	0.020
	7	0.03	1.48				
	3	12.76	24.04	37	$\frac{4}{49}$	-2.069	0.039
	8	0.53	2.31				
	7	0.03	1.48	310.5	$\frac{26}{37}$	-2.409	0.040
	9	0.97	3.80				

Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки); Плазматични клетки**, представени като процент от левкоцитите.



Фигура 6. Сравнителен анализ на ендометриални левкоцити, лимфоцити, Т-лимфоцити, uNK-клетки и плазматични клетки (** представени като процент от всички левкоцити, и * представени като процент от всички клетки) при всички жени ($n = 200$), групирани според профила на микроорганизмите.

6. РЕЗУЛТАТИ ОТ КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ

Целта на настоящото изследване е да проучи корелационните взаимоотношения между ендометриалните имунни клетки при жени с RIF и RPL, за да се разбере по-добре ролята на локалния имунен отговор в ендометриума за развитието на репродуктивните нарушения. Тъй като сумата от процентите на лимфоцити, неутрофили и макрофаги е ограничена до 100%, увеличаването на един вид левкоцити неизбежно води до намаляване на друг. Подобни взаимоотношения могат да се наблюдават между лимфоцитите - Т-лимфоцити и uNK-клетки. Поради тази причина, корелационният анализ между процентните стойности в групата на тези клетки е изключен от настоящото изследване.

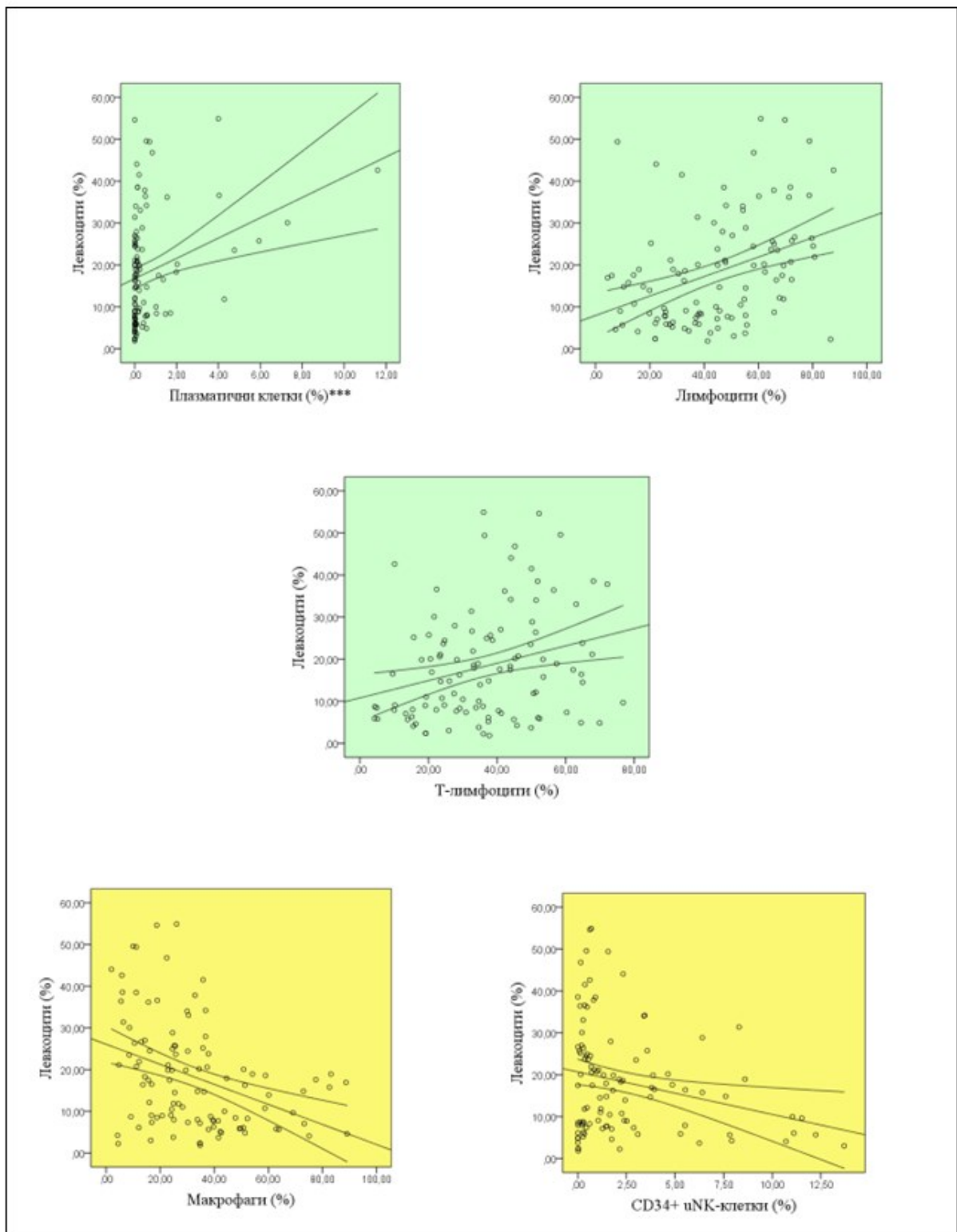
6.1. Резултати от корелационен анализ между ендометриалните клетки в биопсии от жени с RIF

Резултатите от корелационния анализ между различните типове ендометриални имунни клетки при жени с RIF ($n = 107$). Целта на този анализ е да се определят съществуващите взаимовръзки между тези клетки и да се разбере по-добре тяхната роля в ендометриалната среда. Използван е корелационен анализ по Пийърсън. Резултатите са представени в Таблица 6 и Фигура 7, и Фигура 8.

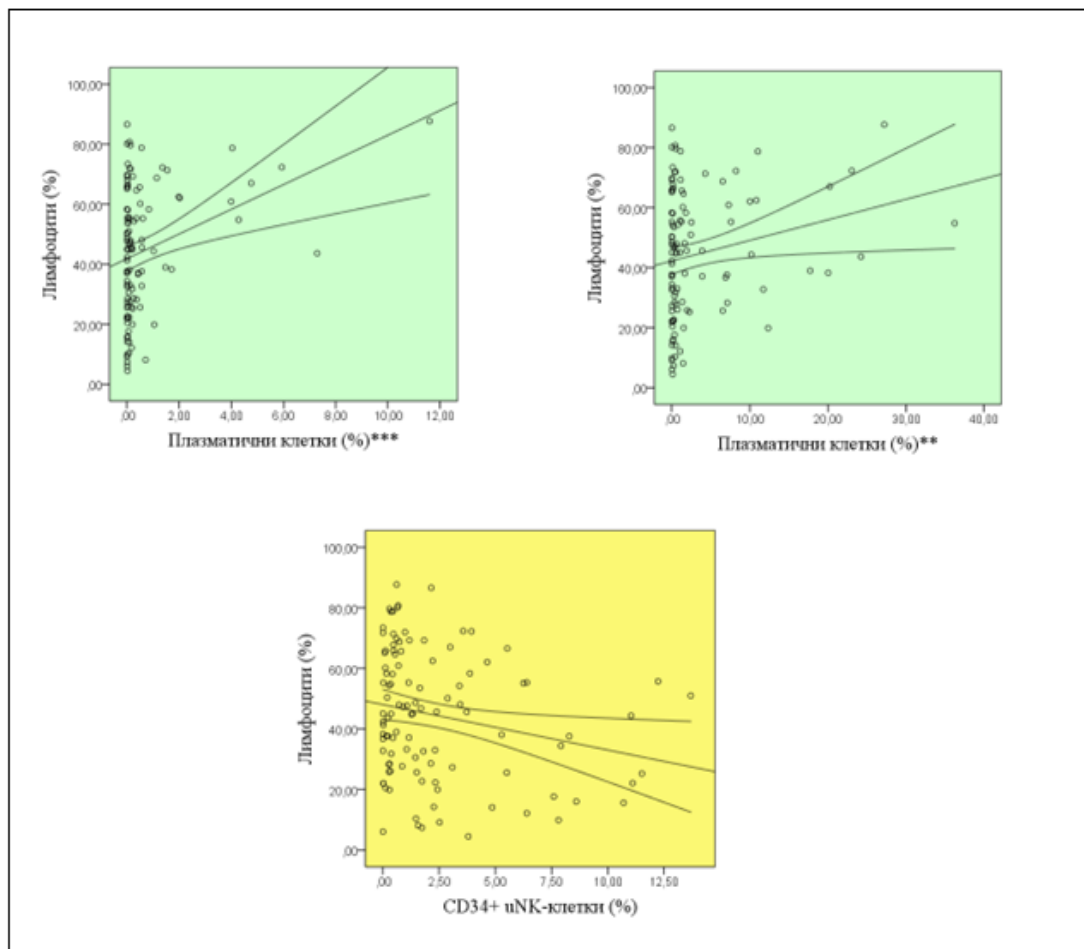
Таблица 6. Корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки при жените с RIF ($n = 107$). Представени са резултатите със статистическа значимост.

Ендометриални имунни клетки, % ($\bar{x} \pm SD$)		<i>r</i>	<i>p</i>
Левкоцити (18.26 ± 12.883)	Лимфоцити (44.49 ± 21.04)	0.379	<0.001
	Т-лимфоцити (36.33 ± 17.17)	0.274	0.004
	CD34+ uNK (2.37 ± 3.11)	-0.245	0.011
	Плазматични клетки* (0.64 ± 1.62)	0.305	0.001
Лимфоцити (44.49 ± 21.04)	CD34+ uNK (2.37 ± 3.11)	-0.222	0.022
	Плазматични клетки** (3.24 ± 6.46)	0.210	0.030
	Плазматични клетки* (0.64 ± 1.62)	0.317	0.001
Макрофаги (32.6 ± 20.48)	CD34+ uNK (2.37 ± 3.11)	0.335	<0.001
	Плазматични клетки* (0.64 ± 1.62)	-0.236	0.014

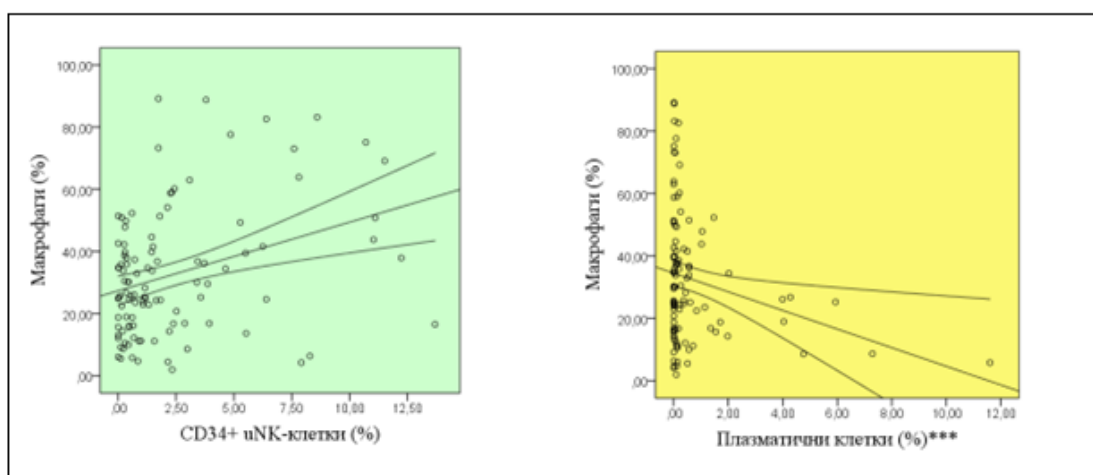
Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки); Плазматични клетки**, представени като процент от левкоцитите.



Фигура 7. Корелационни зависимости на ендометриалните левкоцити при жените с RIF. Позитивните корелации са представени в зелен цвят, отрицателните – в жълт.



Фигура 8. Корелационни зависимости на ендометриалните лимфоцити при жените с RIF. Позитивните корелации са представени в зелен цвят, отрицателните – в жълт.



Фигура 9. Корелационни зависимости на ендометриалните макрофаги при жените с RIF. Позитивните корелации са представени в зелен цвят, отрицателните – в жълт.

Останалите корелационни двойки не показват статистически значими взаимоотношения ($p > 0.05$).

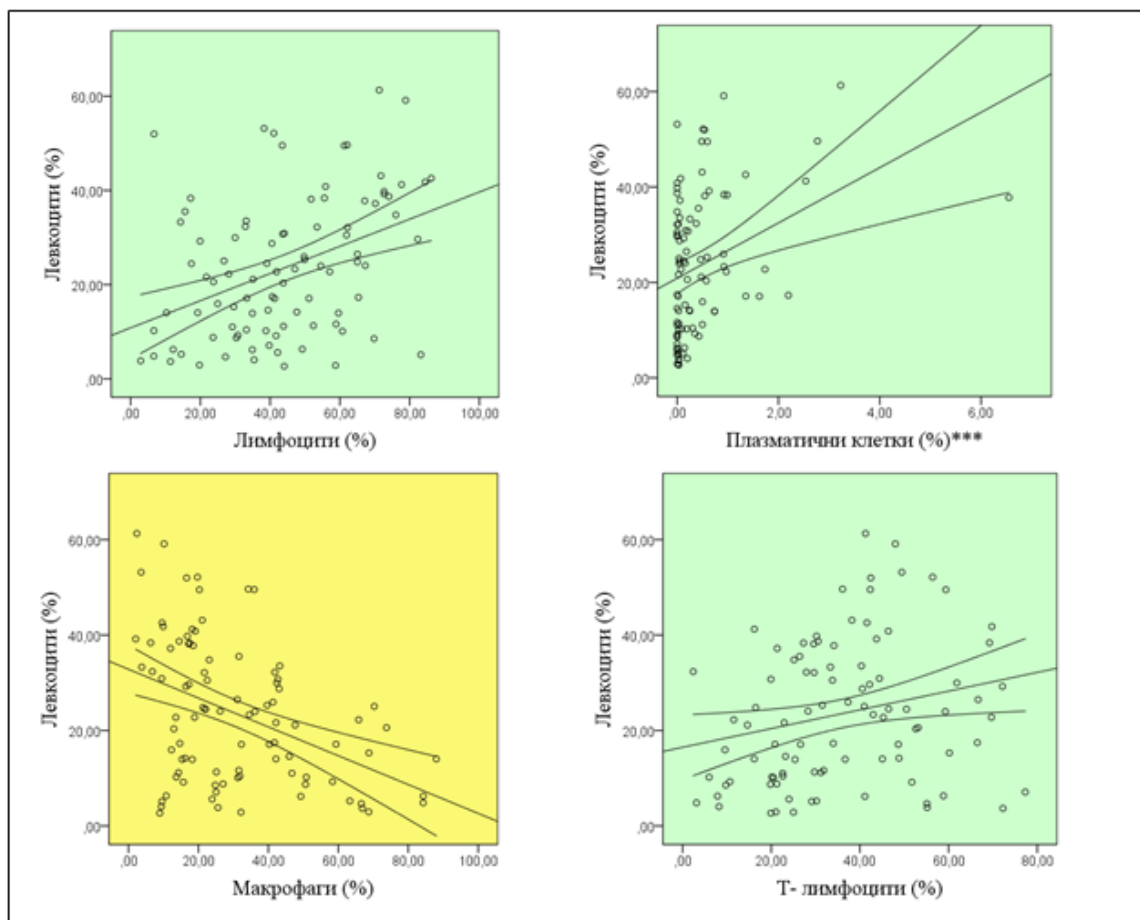
6.2. Резултати от корелационен анализ между ендометриалните клетки в биопсии от жени с RPL

Резултатите от корелационния анализ между ендометриалните клетки в биопсии от жени с RPL са представен в Таблица 7 и Фигура 10-12.

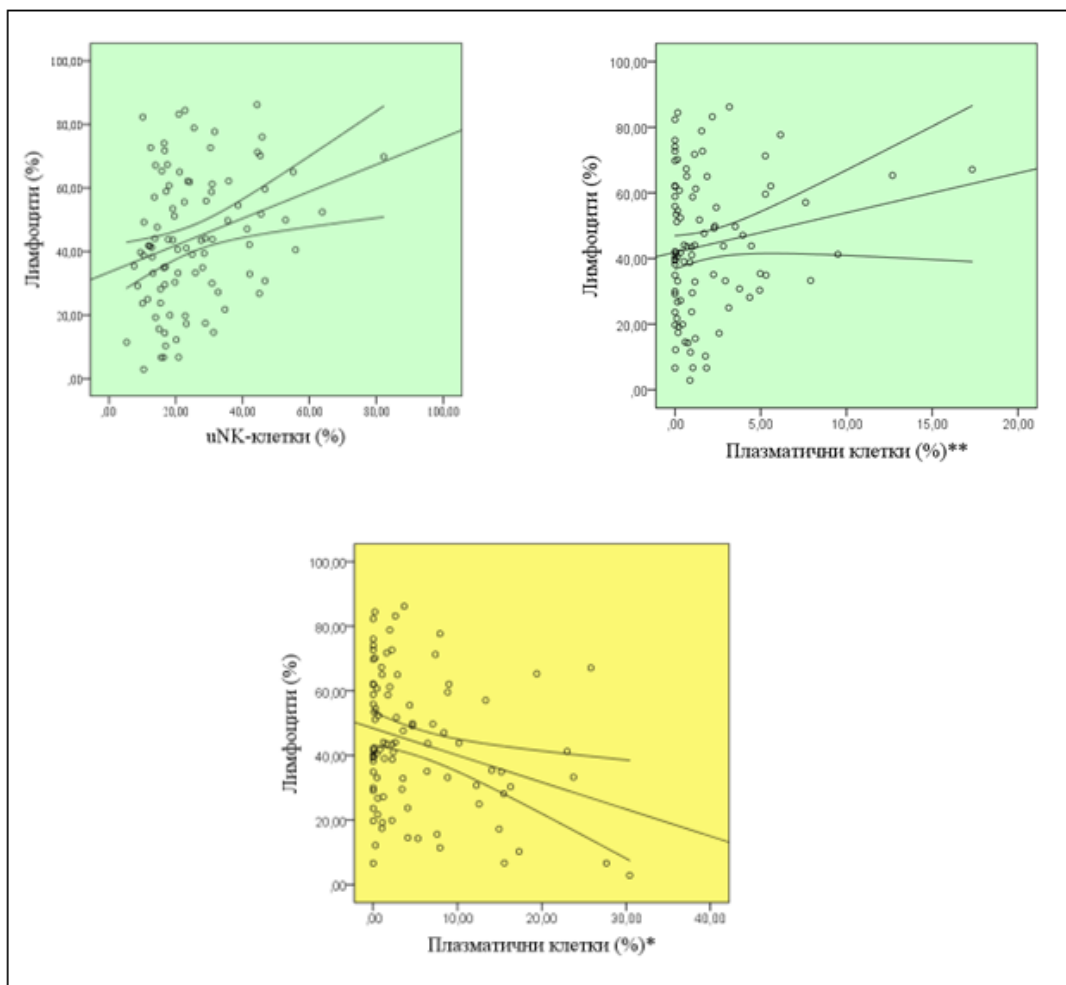
Таблица 7. Корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки при жените с RPL ($n = 93$). Представени са само резултатите със статистическа значимост.

Ендометриални имунни клетки, % ($\bar{x} \pm SD$)		<i>r</i>	<i>p</i>
Левкоцити (23.56 $\pm$ 14.85)	Лимфоцити (44.11 $\pm$ 20.89)	0.405	<0.001
	Макрофаги (30.73 $\pm$ 20.55)	-0.418	<0.001
	Т-лимфоцити (36.03 $\pm$ 17.79)	0.235	0.023
	Плазматични клетки* (0.46 $\pm$ 0.89)	0.348	0.001
Лимфоцити (44.11 $\pm$ 20.89)	Макрофаги (30.73 $\pm$ 20.55)	-0.513	<0.001
	Плазматични клетки*** (5.15 $\pm$ 7.06)	-0.282	0.006
	Плазматични клетки* (0.46 $\pm$ 0.89)	0.269	0.009
	uNK-клетки (25.15 $\pm$ 14.02)	0.284	0.006
Неутрофили (23.97 $\pm$ 19.82)	uNK-клетки (25.15 $\pm$ 14.02)	-0.207	0.047
CD34+ uNK (2.23 $\pm$ 2.91)	uNK-клетки (25.15 $\pm$ 14.02)	-0.212	0.041

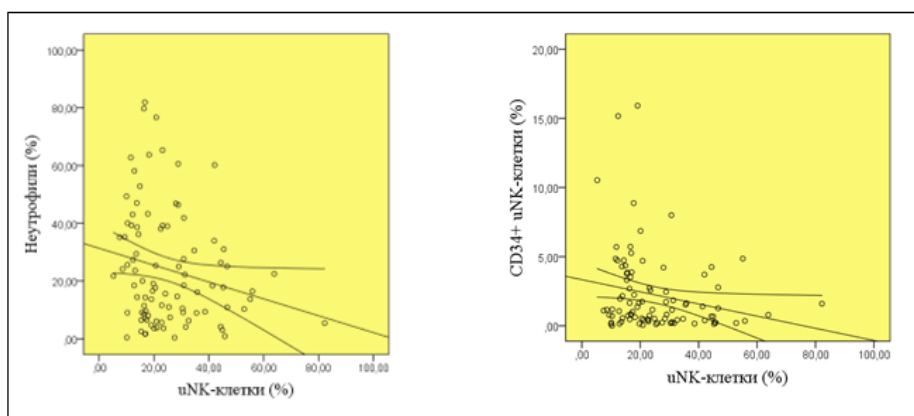
Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки); Плазматични клетки***, представени като процент от лимфоцитите.



Фигура 10. Корелационни зависимости на ендометриалните левкоцити при жените с RPL ($n = 93$). Позитивните корелации са представени в зелен цвят, отрицателните – в жълт.



Фигура 11. Корелационни зависимости на ендометриалните лимфоцити при жените с RPL ($n = 93$). Позитивните корелации са представени в зелен цвят, отрицателните – в жълт.



Фигура 12. Корелационни зависимости на ендометриалните имунни клетки при жените с RPL ($n = 93$).

Останалите двойки не показват статистически значими корелации ($p > 0.05$).

6.3. Корелации между ендометриалните клетки в четирите групи според ЕМ при изследваните жени

Чрез корелационен анализ по Пийрсън се доказват статистически значими връзки между нивата на ендометриалните клетки в различните групи, категоризирани по ЕМ, както е показано в Таблица 8.

Таблица 8. Корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки в четирите групи според ЕМ ($n = 200$). Представени са само резултатите със статистическа значимост.

Групи	Ендометриални имунни клетки, % ($\bar{x} \pm SD$)		<i>r</i>	<i>p</i>
Група А ($n = 41$)	Левкоцити (18.58 ± 13.15)	Плазматични клетки* (0.53 ± 0.94)	0.499	0.001
	Лимфоцити (41.31 ± 19.75)	Плазматични клетки* (0.53 ± 0.94)	0.420	0.006
	Т-лимфоцити (34.47 ± 16.44)	Плазматични клетки*** (6.47 ± 10.71)	-0.337	0.031
	Плазматични клетки* (6.47 ± 10.71)	uNK-клетки (25.68 ± 12.35)	-0.352	0.024
Група В ($n = 57$)	Левкоцити (23.99 ± 14.70)	Лимфоцити (48.41 ± 18.61)	0.478	<0.001
	Левкоцити (23.99 ± 14.70)	Макрофаги (29.01 ± 16.86)	-0.355	0.007
	Левкоцити (23.99 ± 14.70)	Плазматични клетки*** (5.74 ± 11.19)	-0.311	0.019
	Т-лимфоцити (42.49 ± 16.11)	Плазматични клетки** (2.34 ± 4.84)	-0.273	0.040
	Макрофаги (29.01 ± 16.86)	CD34+ uNK-клетки (2.43 ± 3.34)	0.308	0.020
Група С ($n = 25$)	Левкоцити (16.53 ± 13.61)	Лимфоцити (35.60 ± 17.67)	0.424	0.035
	Левкоцити (16.53 ± 13.61)	Макрофаги (33.63 ± 22.83)	-0.598	0.002
	Лимфоцити (35.60 ± 17.67)	Т-лимфоцити (29.48 ± 17.75)	0.493	0.012
Група D ($n = 77$)	Левкоцити (20.80 ± 13.85)	Лимфоцити (45.71 ± 23.28)	0.326	0.004
	Левкоцити (20.80 ± 13.85)	Макрофаги (30.47 ± 20.11)	-0.472	<0.001
	Левкоцити (20.80 ± 13.85)	Плазматични клетки* (0.55 ± 1.49)	0.336	0.003
	Лимфоцити (45.71 ± 23.28)	CD34+ uNK (2.43 ± 3.34)	-0.369	0.001

Лимфоцити (45.71 ± 23.28)	Плазматични клетки** (2.19 ± 4.37)	0.285	0.012
Лимфоцити (45.71 ± 23.28)	Плазматични клетки* (0.55 ± 1.49)	0.317	0.005
Лимфоцити (45.71 ± 23.28)	uNK-клетки (27.49 ± 14.87)	0.287	0.011
Макрофаги (30.47 ± 20.11)	CD34+ uNK-клетки (%) (2.43 ± 3.34)	0.464	<0.001
Макрофаги (30.47 ± 20.11)	Плазматични клетки** (2.19 ± 4.37)	-0.243	0.033
Макрофаги (30.47 ± 20.11)	Плазматични клетки* (0.55 ± 1.49)	-0.279	0.014

Плазматични клетки*, представени като процент от всички ендометриални клетки (левкоцити, стромални клетки, епителни клетки); Плазматични клетки**, представени като процент от левкоцитите; Плазматични клетки***, представени като процент от лимфоцитите.

Останалите двойки не показват статистически значими взаимоотношения ($p > 0.05$).

6.4. Корелации между ендометриалните клетки в деветте групи според микробния профил при изследваните жени

Анализът по Пиърсън, приложен в деветте групи според микробния профил показва следните връзки между ендометриалните клетки (Таблица 9).

Таблица 9. Корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки в групите според вида на микробния профил ($n = 200$). Представени са само резултатите със статистическа значимост.

Групи	Ендометриални имунни клетки, % ($\bar{x} \pm SD$)		<i>r</i>	<i>p</i>
Група 1 ($n = 6$)	Неутрофили (36.61 ± 30.86)	Т-лимфоцити (54.47 ± 18.23)	-0.926	0.008
	Неутрофили (36.61 ± 30.86)	CD34+ uNK (0.99 ± 1.07)	0.838	0.037
	Т-лимфоцити (54.47 ± 18.23)	CD34+ uNK (0.99 ± 1.07)	-0.934	0.006
Група 2 ($n = 18$)	Левкоцити (19.00 ± 15.70)	Плазматични клетки* (0.47 ± 0.63)	0.549	0.018
	Лимфоцити (44.67 ± 23.67)	uNK-клетки (24.76 ± 18.50)	0.486	0.041
	Лимфоцити (44.67 ± 23.67)	CD34+ uNK (2.24 ± 3.03)	-0.499	0.035
	Макрофаги (30.40 ± 18.92)	CD34+ uNK (2.24 ± 3.03)	0.747	<0.001
Група 3 ($n = 4$)	Неутрофили (20.20 ± 9.21)	Т-лимфоцити (35.40 ± 17.36)	0.957	0.043
Група 4	Левкоцити (20.08 ± 12.34)	CD34+ uNK (4.21 ± 4.84)	-0.755	0.001

(n = 15)	Плазматични клетки* (2.67 ± 5.75)	CD34+ uNK (4.21 ± 4.84)	0.518	0.048
	Плазматични клетки** (1.30 ± 2.55)	CD34+ uNK (4.21 ± 4.84)	0.537	0.039
Група 5 (n = 12)	Левкоцити (13.70 ± 6.90)	Т-лимфоцити (30.32 ± 12.74)	0.582	0.047
	Лимфоцити (39.04 ± 18.56)	Плазматични клетки** (3.04 ± 3.85)	0.709	0.010
	Лимфоцити (39.04 ± 18.56)	Плазматични клетки* (0.47 ± 0.63)	0.694	0.012
	Макрофаги (36.89 ± 23.25)	Плазматични клетки*** (7.67 ± 8.65)	-0.594	0.042
	Неутрофили (24.06 ± 20.08)	Плазматични клетки*** (7.67 ± 8.65)	0.661	0.019
Група 6 (n = 33)	Левкоцити (19.11 ± 11.84)	Макрофаги (33.23 ± 24.36)	-0.579	<0.001
	Левкоцити (19.11 ± 11.84)	Неутрофили (28.20 ± 23.89)	0.421	0.015
	Левкоцити (19.11 ± 11.84)	Т-лимфоцити (34.64 ± 20.30)	0.415	0.016
Група 7 (n = 26)	Левкоцити (18.73 ± 13.38)	Лимфоцити (45.54 ± 19.48)	0.72	<0.001
	Левкоцити (18.73 ± 13.38)	Макрофаги (31.28 ± 16.67)	-0.472	0.015
Група 8 (n = 49)	Левкоцити (24.47 ± 15.00)	Лимфоцити (47.79 ± 19.63)	0.53	<0.001
	Левкоцити (24.47 ± 15.00)	Макрофаги (29.24 ± 17.56)	-0.372	0.009
	Левкоцити (24.47 ± 15.00)	Плазматични клетки*** (6.09 ± 11.68)	-0.318	0.026
	Макрофаги (29.24 ± 17.56)	CD34+ uNK (2.16 ± 3.18)	0.341	0.017
Група 9 (n = 37)	Левкоцити (19.28 ± 13.43)	Плазматични клетки* (0.57 ± 0.98)	0.493	0.002
	Лимфоцити (39.80 ± 20.02)	Плазматични клетки** (2.58 ± 3.52)	0.348	0.035
	Лимфоцити (39.80 ± 20.02)	Плазматични клетки* (0.57 ± 0.98)	0.474	0.003
	Т-лимфоцити (34.35 ± 16.67)	Плазматични клетки*** (6.89 ± 11.20)	-0.348	0.035
	uNK-клетки (24.96 ± 12.63)	Плазматични клетки*** (6.89 ± 11.20)	-0.346	0.036

Плазматични клетки* (CD45+, CD138+), представени като процент спрямо всички лимфоцити, плазматични клетки**, представени като процент спрямо всички левкоцити и плазматични клетки*** спрямо всички клетки (левкоцити, стромални клетки и епителни клетки).

Останалите двойки не показват статистически значими взаимоотношения ($p > 0.05$).

6.5. Корелации между ендометриалните клетки в биопсии от група 1 до група 9 при всички изследвани жени

Проведен е корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки в биопсиите с над 90% лактобацили и без бактериални и микотични агенти (група 9) и всички останали биопсии. Данните са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Корелационен анализ между ендометриалните имунни клетки в биопсиите с лактобацили над 90% и под 90% ($n = 200$). Представени са само резултатите със статистическа значимост.

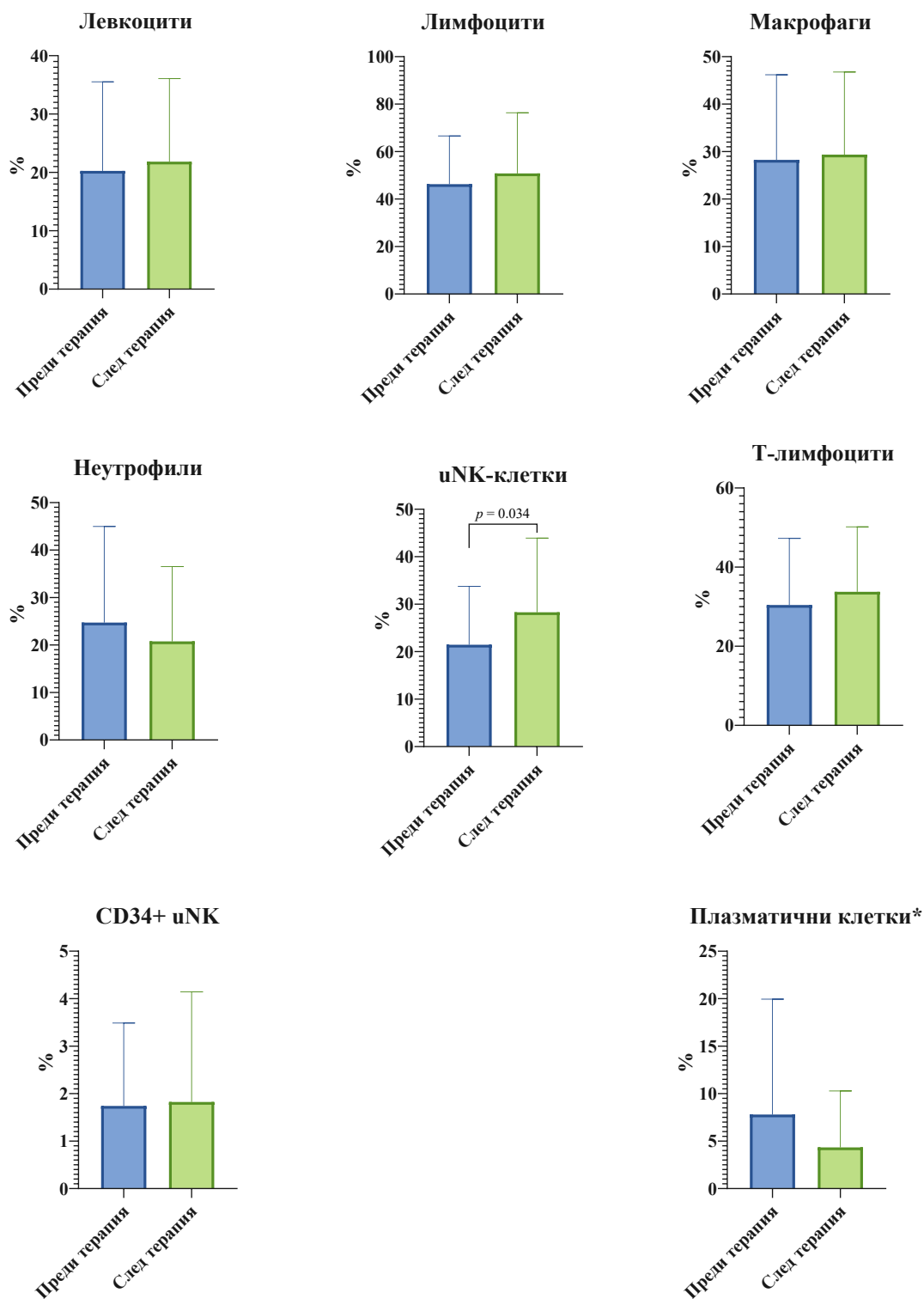
Групи	Ендометриални имунни клетки, % ($\bar{x} \pm SD$)		<i>r</i>	<i>p</i>
Група 9 ($n = 37$)	Левкоцити (19.28 $\pm$ 13.43)	Плазматични клетки* (0.57 $\pm$ 0.98)	0.493	0.002
	Лимфоцити (39.80 $\pm$ 20.02)	Плазматични клетки** (2.58 $\pm$ 3.52)	0.348	0.035
	Лимфоцити (39.80 $\pm$ 20.02)	Плазматични клетки* (0.57 $\pm$ 0.98)	0.474	0.003
	Т-лимфоцити (34.35 $\pm$ 16.67)	Плазматични клетки*** (6.89 $\pm$ 11.20)	-0.348	0.035
Групи 1-8 ($n = 163$)	Левкоцити (21.04 $\pm$ 14.21)	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	0.394	0.000
	Левкоцити (21.04 $\pm$ 14.21)	Макрофаги (30.32 $\pm$ 19.23)	-0.448	0.000
	Левкоцити (21.04 $\pm$ 14.21)	Т-лимфоцити (36.61 $\pm$ 17.61)	0.234	0.003
	Левкоцити (21.04 $\pm$ 14.21)	CD34+ uNK-клетки (2.23 $\pm$ 2.95)	-0.197	0.012
	Левкоцити (21.04 $\pm$ 14.21)	Плазматични клетки* (0.55 $\pm$ 1.40)	0.254	0.001
	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	Т-лимфоцити (36.61 $\pm$ 17.61)	0.166	0.034
	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	uNK-клетки (25.00 $\pm$ 13.45)	0.265	0.001
	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	CD34+ uNK-клетки (2.23 $\pm$ 2.95)	-0.204	0.009
	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	Плазматични клетки** (2.60 $\pm$ 5.45)	0.165	0.035
	Лимфоцити (45.33 $\pm$ 21.04)	Плазматични клетки* (0.55 $\pm$ 1.40)	0.268	0.001
	Макрофаги (30.32 $\pm$ 19.23)	Т-лимфоцити (36.61 $\pm$ 17.61)	-0.185	0.018
	Макрофаги (30.32 $\pm$ 19.23)	CD34+ uNK-клетки (2.23 $\pm$ 2.95)	0.261	0.001
	Макрофаги (30.32 $\pm$ 19.23)	Плазматични клетки* (0.55 $\pm$ 1.40)	-0.219	0.005
	Неутрофили (23.57 $\pm$ 18.66)	uNK-клетки (25.00 $\pm$ 13.45)	-0.192	0.014

Плазматични клетки*, представени като процент от ендометриалните клетки (левкоцити, стромални клетки и епителни клетки); Плазматични клетки**, представени като процент спрямо всички левкоцити; Плазматични клетки*** (CD45+, CD138+), представени като процент от лимфоцитите.

7. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ЕНДОМЕТРИАЛНИТЕ ИМУННИ КЛЕТКИ ПРЕДИ И СЛЕД ПРОВЕДЕНА АНТИБИОТИЧНА И ПРОБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ

Флоуцитометричното изследване на ендометриалните имунни клетки преди и поне един месец след проведена антибиотична и пробиотична терапия на 46 проследени жени показва, че има статистически значима разлика в uNK-клетки преди и след лечението. Използван е тестът на Wilcoxon Signed Rank, $Z = -2.059$, $p = .039$. За да се сравнят uNK-клетки преди и след лечение, разликите в процентната им стойност за всяка жена се подреждат по големина и се рангират. След това се изчислява средният ранг за двете групи, за да се оцени средната степен на промяна. Средният ранг на uNK-клетки след лечение е по-висок ($Mdn = 26.04$) от средния ранг преди лечение ($Mdn = 19.56$). Това предполага, че лечението е довело до значително увеличение на uNK-клетки при пациентите.

Средните стойности на левкоцитите, лимфоцитите, макрофагите, Т-лимфоцитите и прогениторните NK-клетки също са по-високи след терапията, но липсва статистическа значимост. Средните стойности на неутрофилите и плазматичните клетки са по-ниски след терапия, при липса на статистическа значимост (Фигура 13).



Фигура 13. Резултати от флоуцитометричен анализ на ендометриалните имунни клетки преди и след терапия при жени с репродуктивен неуспех ($n = 46$). Плазматични клетки* (CD45+, CD138+), представени като процент от всички лимфоцити.

8. РАЖДАЕМОСТ СЛЕД ПЪРВАТА ART ПРОЦЕДУРА С ПРЕДВАРИТЕЛНО ПРОВЕДЕНА АНТИБИОТИЧНА И ПРОБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ

След завършване на антибиотичната и пробиотична терапия, насочена към лечение на ендометриалната дисбиоза, пациентките са проследени по отношение на раждаемостта, за да се оцени ефекта на нарушенията на ендометриалната микробиота върху репродуктивния резултат. Данните за раждаемостта след първата, по отношение на проведената терапия, ART процедура (ICSI) са представени на Таблица 11 и Таблица 12, като се сравняват различните групи пациентки, според нарушението на ендометриалната микробиота. Следващите таблици представят значението на нормалната ЕМ на ендометриалната микробиота върху изхода от бременността.

Таблица 11. Сравнение на резултатите от първата ART (ICSI) процедура след проведена антибиотична и пробиотична терапия между групата с нормална ЕМ (Група А), и останалите групи с нарушение на ендометриалната микробиота. Данните за раждаемостта са валидни към 2024 г.

Пациентки	Отрицателен hCG тест <i>n</i> (%)	Спонтанен аборт <i>n</i> (%)	Текуща бременност <i>n</i> (%)	Раждаме <i>n</i> (%)
Група А <i>n</i> = 41	18 (43.9)	1 (2.44)	3 (7.32)	19 (46.34)
Групи В, С и D <i>n</i> = 159	83 (52.2)	18 (11.3)	21 (13.2)	37 (23.3)
Общо <i>n</i> = 200	101 (50.5)	19 (9.5)	24 (12.0)	56 (28.0)

Жените с ендометриална биопсия, показваща нормална ЕМ, демонстрират статистически значимо по-високи нива на раждаемост в сравнение с останалите жени ($\chi^2(2, n = 200) = 10.053, p = 0.007$).

Таблица 12. Сравнение на резултатите от първата ART (ICSI) процедура след проведена антибиотична и пробиотична терапия между различните групи според вида на нарушение на ендометриалната микробиота. Данните за раждаемостта са валидни към м. декември, 2024 г.

Пациентки	Отрицателен hCG тест <i>n</i> (%)	Спонтанен аборт <i>n</i> (%)	Текуща бременност <i>n</i> (%)	Раждаме <i>n</i> (%)
Група А <i>n</i> = 41	18 (43.9)	1 (2.44)	3 (7.32)	19 (46.34)
Група В <i>n</i> = 57	29 (50.9)	8 (14.0)	8 (14.0)	12 (21.05)
Група С <i>n</i> = 25	13 (52.0)	3 (12.0)	2 (8.0)	7 (28.0)
Група D <i>n</i> = 77	41 (53.2)	7 (9.1)	11 (14.4)	18 (23.37)
Общо <i>n</i> = 200	101 (50.5)	19 (9.5)	24 (12.0)	56 (28.0)

9. АЛГОРИТЪМ ЗА ДИАГНОСТИЧНО И ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ЖЕНИ, ПЛАНИРАЩИ АРТ

- 9.1. След преминаване на оценка за допустимост, следва изследване на влагалище и цервикс:
 - 9.1.1. Извършване на микробиологично изследване на вагинален секрет;
 - 9.1.2. Извършване на RT-PCR (Femoflor screen) на цервикален секрет.
- 9.2. При положителен резултат за дисбиотични микроорганизми:
 - 9.2.1. Терапия на дисбиозата с антибиотици и пробиотици;
 - 9.2.2. Контролно изследване на влагалищен и цервикален секрет след приключване на терапията.
- 9.3. След отрицателен тест за дисбиотични микроорганизми, изследване на ендометриална биопсия по време на средна лутеална фаза.
- 9.4. Изследване на ендометриалната микробиота за идентифициране на видовото разнообразие и количество на микроорганизмите:
 - 9.4.1. Оценка на локалния имунен профил;
 - 9.4.2. Терапия на дисбиозата с антибиотици и пробиотици;
 - 9.4.3. Терапия на хроничен ендометрит (при плазматични клетки над 1% от всички клетки, с антибиотици и пробиотици).
- 9.5. Обсъждане на допълнителни изследвания за диагностика на хроничен ендометрит (ДНК анализ за EBV, CMV, HSV-1,2).
- 9.6. Обсъждане на подходяща имуномодулираща терапия при идентифициране на дисбаланс между популациите на ендометриалните имунни клетки (кортикостероиди, IVIg, Intralipid).
- 9.7. Продължаване към процедурата на АРТ.

VI. ДИСКУСИЯ

1. ВЪЗРАСТОВО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЖЕНИ В РАЗЛИЧНИТЕ ГРУПИ

Възрастта е важен фактор, който влияе върху репродуктивния потенциал на жените. С напредването на възрастта количеството и качеството на яйцеклетките намаляват, което затруднява зачеването (Kawamura, Tomari et al. 2020, Lucas, Vrljicak et al. 2020). Изследванията показват, че след 35-годишна възраст се наблюдава промяна в експресията на гените, свързани с функциите на ендометриалната лигавица, което може да повлияе на имплантацията на ембриона (Devesa-Peiro, Sebastian-Leon et al. 2022). Затова е важно, при такива изследвания, да се има предвид възрастовото разпределение на различните групи. В настоящото проучване не се открива значителна разлика между възрастта и вида на нарушение на ендометриалната микробиота или профила на микроорганизмите. Липсата на значимост между различните възрастови групи, ни позволява да изключим влиянието на възрастта върху получените резултати. Този факт подкрепя валидността на изводите и анализите, което позволява да се фокусират други потенциални фактори или механизми, които могат да са свързани с репродуктивните неуспехи при изследваните групи.

2. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ РАЗПРЕДЕЛЕНИЕТО НА БИОПСИТЕ ПО ГРУПИ НА ЕНДОМЕТРИАЛНА МИКРОБИОТА. ВРЪЗКА МЕЖДУ МИКРОБИОТАТА И РЕПРОДУКТИВНОТО ЗДРАВЕ

Целта на извършените изследвания е да се проучи ендометриалната микробиота при български пациентки с RIF и RPL и да се оцени нейното влияние върху ендометриалните имунни клетки.

За разлика от влагалището, ендометриумът е по-слабо проучен като среда, благоприятстваща развитието на коменсални бактерии. Матката, дълго време, се е считала за стерилна, а наличието на бактерии в проби от ендометриума, плацентата или амниотичната течност се е разглеждало като патологично (Harris and Brown 1927). Трудността при вземането на чисти проби от ендометриум допълнително ограничава проучванията в тази област. Развитието на нови микробиологични методи, алтернативни на класическите чрез култивиране, доведе до натрупване на все повече данни, потвърждаващи разнообразието и динамиката на бактериалните общности в ендометриума. Ролята на тези общности за репродуктивното здраве е обект на интензивни изследвания и все още се дискутира (Koedooder, Mackens et al. 2018). Сложните и динамични взаимодействия между микробиотата, имунната система и ендометриума формират микросредата на матката. Промяната във всеки един от тези компоненти може да инициира събития, които нарушават това деликатно равновесие и водят до редица патологични промени (Zhu, Yang et al. 2022). Представеното проучване отразява текущото състояние на тази микросреда по време на средната лутеална фаза,

което представлява специфичната област, от която е получена биопсията на ендометриума.

Молекулярно-генетичният анализ показва, че 77 биопсии имат значително нарушена микробиота, чийто профил се характеризира с преобладаване на дисбиотични бактерии и под 90% *Lactobacillus* spp. Резултатите потвърждават, че промените в бактериалните съобщества в маточната кухина са свързани с репродуктивни усложнения, включващи състояния като RPL и RIF (Kitaya, Nagai et al. 2019, Hernandez, Silveira et al. 2020, Diaz-Martínez, Bernabeu et al. 2021, Lozano, Bernabeu et al. 2021, Ravel, Moreno et al. 2021).

В настоящото проучване при жените с RIF най-ниски средни стойности на uNK-клетки са установени в трета група ЕМ, където са наблюдавани най-високи средни процентни стойности на плазматичните клетки. Тези резултати съвпадат с предходно изследване, включващо 23 жени с необяснимо безплодие, където са взети проби от маточната лигавица по време на фоликуларната и късната секреторна фаза. Иmunните клетки в пробите са анализирани чрез флоуцитометрия. Жените са разделени на две групи: девет жени с диагностициран хроничен ендометрит и четиринадесет жени без хроничен ендометрит. Резултатите показват, че жените с хроничен ендометрит имат по-нисък процент от определени видове имунни клетки (CD56⁺ CD16⁻ и CD56^{bright} CD16⁻), но и по-висок процент CD3⁺ клетки в ендометриума в сравнение с жените без хроничен ендометрит, което противоречи на получените резултати (Matteo, Cicinelli et al. 2009).

Резултатите от настоящото изследване потвърждават, че при възпаление на ендометриума се наблюдава увеличение на общия брой на левкоцитите (Disep, Innes et al. 2004). Това е очакван резултат, тъй като възпалението предизвиква миграция на имунни клетки към засегнатата тъкан. Интересно е да се отбележи, че макар общият брой на левкоцитите да се увеличава при всички пациенти с ендометрит, съставът на тези клетки може да варира в значителна степен. В предходното проучване е изследвана ендометриална тъкан от 79 жени с ендометрит и 22 жени, контроли с нормален хистологичен резултат. Левкоцитите са характеризирани имунохистохимично за CD45, CD20, CD68, CD3 и CD56, а броят им е анализиран полуколичествено по скала от 0 до 4. В много от случаите на ендометрит общият брой на левкоцитите е увеличен. Въпреки че броят на макрофагите, Т-лимфоцитите и uNK-клетки не се различават между пробите с ендометрит и контролите, повечето случаи на ендометрит съдържат значително увеличен брой В-лимфоцити, които обикновено представляват 1% или по-малко от популацията на ендометриалните левкоцити. В настоящото проучване се установяват значими различия в процентните стойности на лимфоцити, uNK-клетки и Т-лимфоцити между различните групи, докато предходното проучване не открива значими различия в броя на макрофагите, Т-лимфоцитите и ендометриалните NK-клетки. Това предполага, че имунният отговор при дисбиоза и ендометрит може да бъде много хетерогенен и да зависи от различни фактори, като например стадий на нарушението, причинителя на възпалението и индивидуалните особености на пациентите. Освен това, настоящото проучване отбелязва увеличение на неутрофили в някои групи, докато предходното проучване се фокусира основно върху В-лимфоцити. Това подчертава важността на изследването на различните видове

имунни клетки, за да се получи пълна картина на имунния отговор при ендометрит (Disep, Innes et al. 2004).

Настоящото изследване потвърждава, че възпалението на ендометриума води до значителни промени в имунния отговор. Въпреки това, задълбоченият анализ разкрива по-сложна картина от очакваното. В сравнение с предишни проучвания, които са фокусирали основно върху увеличението на В-лимфоцити, настоящото изследване установява по-широка гама от имунни клетки, участващи в патогенезата на ендометрита. Наблюдаваните различия в имунния профил могат да имат важни клинични последици, като например да повлияят на отговора на лечението и прогнозата на заболяването.

При сравнение на подобни резултати трябва да се отбележи разликата в методиката за оценка на имунните клетки. Имунохистохимичният анализ, въпреки че е ценен инструмент, може да затрудни прецизното количествено определяне на нивата на експресия на антигена.

Анализът на имунния профил, при пациенти с RIF и RPL (в Таблица 4) на настоящото изследване, не съответства напълно на резултатите от по-обширно проучване, обхващащо 455 пациентки. Докато предишното изследване отчита по-високи нива на NK-клетки и В-лимфоцити при пациентки с RIF, настоящото проучване не потвърждава тази тенденция (Marron and Harrity 2019). Възможните причини за това могат да се дължат на различия в методологията, размера на извадката и включените критерии.

От друга страна, има сходства в част от получените резултати, тъй като изследването на ендометриалните имунни клетки след антибиотичното лечение показва статистически значимо по-високи стойности на uNK-клетки и по-ниски стойности на плазматични клетки. Това съответства на наблюдаваните по-високи стойности на uNK-клетки и по-ниски В-лимфоцити в контролните биопсии (Marron and Harrity 2019). По-ниските процентни стойности на плазматичните клетки след терапия, макар и да липсва статистическа значимост, потвърждават тенденцията към нормализиране на имунния профил на ендометриума, което може да е показател за ефективността на лечението.

Ендометриалната микробиота може да повлияе на репродуктивните резултати чрез взаимодействие с вагиналната микробиота и системните имунни реакции. Дисбиозата във вагиналната микробиота се свързва с неблагоприятни резултати от бременността и има доказателства, че може да се наблюдава кръстосано взаимодействие между вагиналната и ендометриалната микробиота, което да повлияе на локалната и системната имунна среда в репродуктивния тракт (Skafte-Holm, Humaidan et al. 2021). Резултатите от това проучване потвърждават ключовата роля на нормалната ендометриална микробиота, характеризираща се с наличието на повече от 90% *Lactobacillus* spp., за постигане на оптимална имплантация и развитие на ембриона (Espinosa, Fabregues et al. 2021). Някои видове лактобацили, познати като пробиотици, са способни да потискат свръхрастежа на други бактерии. Това се дължи на тяхната способност да произвеждат (H_2O_2). Водородният пероксид е токсичен за микроорганизмите, които не могат да го разградят (например, липса на каталаза). Предполага се, че липсата на лактобацили, продуциращи H_2O_2 , може да доведе до

разрастване на каталазо-негативни бактерии, които не са податливи на този токсин (Bhattacharya, Dutta et al. 2023).

Следователно, възможността за използване на пробиотици, за модулиране на ендометриалната микробиота, може да предложи нови стратегии за подобряване на репродуктивното здраве при жените с RIF и RPL. Допълнителни изследвания могат да се фокусират върху идентифицирането на специфични пробиотични щамове, които могат да възстановят нормалната микробиотична среда в матката.

3. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИМУННИТЕ КЛЕТКИ В ЕНДОМЕТРИУМ ОТ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НАРУШЕНИЯ В ГРУПИТЕ СПОРЕД НАРУШЕНИЕТО НА ЕМ

Средната процентна стойност на левкоцитите, която се наблюдава в биопсиите, съответства на тази, докладвана в предходни проучвания, което доказва валидността на процедурата за вземане на проби и обработка. По време на средната лутеална фаза левкоцитите могат да съставляват до 30% от общата популация на стромалните клетки (Salamonsen and Woolley 1999).

В настоящото проучване е извършен сравнителен анализ на имунния профил на ендометриални биопсии взети по време на средна лутеална фаза от МЦ, от жени с различна ЕМ. Ендометриумът се характеризира с разнообразие от вродени имунни клетки, основно макрофаги, и неутрофили, и адаптивни имунни клетки, като Т- и В-лимфоцити (Kitazawa, Kimura et al. 2020). Те се намират в значително количество в лимфоидните агрегати на базалния слой, както и между стромалните и епителните клетки (Vallvé-Juanico, Houshdaran et al. 2019). През пролиферативния и секреторния етап на менструалния цикъл, ендометриалните имунни клетки претърпяват постпенно съзряване, което им позволява да поддържат физиологичната имунна микросреда на матката, и да участват в процесите на ендометриално ремоделиране, децидуализация и имплантация на ембриона (Agostinis, Mangogna et al. 2019, Kitazawa, Kimura et al. 2020). Функциите на имунните клетки са разнообразни. Техният вид, брой и активационен статус се регулират основно от хормоналната среда (Vallvé-Juanico, Houshdaran et al. 2019, Kitazawa, Kimura et al. 2020). В периода на ранната бременност, те могат да достигнат 40% от общия брой клетки в матката. Т-лимфоцитите, представени от Treg участват във формирането на майчино-феталната имунна толерантност. Най-често срещаните децидуални имунни клетки са uNK-клетки. Те представляват 70% от общия брой на локалните имунни клетки. Функционално, uNK-клетки регулират инвазията на трофобласта и подобряват съдовото ремоделиране чрез екстравилозните трофобласти, макрофаги и дендритни клетки, като запазват способността да предпазват от инфекции (Zhu, Yang et al. 2022).

В предходно изследване на ендометриалния имунен профил при пациентки с RPL и RIF, които са постигнали раждане (RPL, $n = 24$; RIF, $n = 14$), се установяват значително по-високи средни процентни стойности на uNK-клетки при жените с RIF в сравнение с тези с RPL ($p = 0.008$) (Braun, Vomstein et al. 2023). В настоящото проучване не се открива подобна разлика за uNK-клетки, както и за всички изследвани клетки.

Анализът на ендометриалните клетки между четирите групи според нарушението на ендометриалната микробиота показва някои статистически значими разлики. Засега липсват подобни сравнения. Според литературните данни до момента, е известно, че микробиотата влияе на имунната система и модулира локалния имунен отговор (D'Ippolito, Di Nicuolo et al. 2018). Промените в имунната микросреда влияе върху процесите на ендометриално ремоделиране, децидуализация и имплантация на ембриона, което обяснява репродуктивните нарушения, наблюдавани при жените от изследваните групи.

В група А се доказват най-високи средни процентни стойности на CD34+ uNK-клетки, като се установява статистически значима разлика между група А и група С. В научната литература прогениторните uNK-клетки се разглеждат във връзка с противоречивите данни за произхода на uNK-клетки в децидуата. Установено е, че децидуалната тъкан съдържа CD34+ прекурсори, които могат да се диференцират *in vitro* в зрели NK-клетки със сходен фенотип и функция на dNK-клетки (Vacca, Vitale et al. 2011). Това предполага, че тези CD34+ клетки са линейно ангажирани към NK-клетките. Освен това, децидуалната микросреда привлича NK-клетки от периферната кръв по време на бременност (Carlino, Stabile et al. 2008, Santoni, Carlino et al. 2008) където, придобиват характеристики на децидуални NK-клетки под влияние на локалните фактори (Vacca, Chiossone et al. 2019). Произходът на uNK-клетки вероятно е хетерогенен, както от CD34+ прекурсори в децидуата, така и NK-клетки от периферна кръв, които се адаптират към локалната среда. Високите нива на CD34+ uNK-клетки в група А предполагат по-активно развитие на uNK-клетки от CD34+ прекурсори в децидуалната тъкан. Възможно е в група А да има по-интензивен микроекологичен стимул, който благоприятства диференциацията на CD34+ прекурсори в uNK-клетки. Липсата на достатъчно данни относно ролята на ендометриалната микробиота в развитието на CD34+ uNK-клетки, е ключова област за бъдещи изследвания. Интересен е въпросът дали този резултат се дължи на лактобацилите и техните метаболити. Подобни наблюдения са получени в много стари проучвания, които доказват, че чревната микробиота насърчава развитието на епителните стволови клетки (Abrams, Bauer et al. 1963, Leshner, Walburg et al. 1964). Подобни резултати показва проучване върху дисбиозата в чревната микробиота и нейното влияние върху активността на чревните стволови клетки и патогенезата на некротичния ентероколит. Kim и съавт., извършват анализ на единични клетки при мишки, третирани с антибиотици. Чревната микробиота стимулира диференциацията на стволовите клетки в Панетови клетки, но чрез регулация на макрофагите и пролиферацията на мезенхимните клетки, за разлика от нашето проучване. Когато развитието на тези компоненти на стволовите клетки е нарушено от дисбиоза, новородените мишки могат да развият некротичен ентероколит. Освен това, анализът на микробиома показва, че *Lactobacillus* е значително по-малко в случаите с некротичен ентероколит и/или при антибиотично лечение, докато лечението с *Lactobacillus* частично възстановява състоянието на мишките с некротичен ентероколит (Kim, Li et al. 2022).

В заключение, резултатите от това проучване показват, че ендометриалната микробиота може да играе важна роля в регулирането на прогениторните uNK-клетки, които са ключов компонент на имунната система на матката.

Значително по-високите нива на левкоцити и лимфоцити в група В спрямо група С насочва към изява на възпаление в група В, като подчертава значението на лактобацилите за установяване локалната имунна хомеостаза. Лактобацилите са ключов компонент на ендометриалния микробиом при здрави жени в детородна възраст. Тези бактерии са известни със своите противовъзпалителни свойства и способността си да модулират имунния отговор. Ролята им в имунната регулация е свързана със секреция на млечна киселина, която инхибира производството на провъзпалителни цитокини и хемокини чрез активиране на TLR (Rautava, Collado et al. 2012, Esmaeili, Mahmoudi et al. 2018). Тези бактерии намаляват експресията на ко-стимулаторните молекули и увеличават експресията на имунорегулаторните молекули върху дендритните клетки (DCs). Също така лактобацилите могат да инхибират провъзпалителната генна експресия в ендометриалните клетки (Liu, Feng et al. 2022).

Получените резултати подкрепят данните от проучване върху лактобацилите *L. delbrueckii* и *L. rhamnosus*, доказващо генериране на толерогенни ефекти върху имунната система (Esmaeili, Mahmoudi et al. 2018). Липсата на лактобацили може да засегне имунната система по няколко начина чрез:

- Повишена експресия на про-възпалителни маркери (HLA-DR, CD86, CD80, CD83 и IL-12) в незрели DCs. Това може да доведе до по-висока активация на имунната система и увеличение на възпалението;
- Намалена експресия на противовъзпалителни цитокини като IL-10, IL-2 и IDO. Тези молекули играят важна роля в регулирането на имунния отговор и поддържането на имунната толерантност. Намаляването на нивата им може да доведе до дисбаланс в имунната система и повишена склонност към възпалителни и автоимунни реакции;
- Промените във функцията на DCs, които без подходяща регулация от лактобацилите могат да станат прекомерно активни и да представят антигени на Т-лимфоцитите по начин, благоприятстващ възпалението, вместо да индуцират имунологична толерантност.

В друго проучване *L. rhamnosus* GR-1 е тестван върху говежди ендометриални епителни клетъчни култури, предварително заразени с *E. coli*. Резултатите показват, че *L. rhamnosus* GR-1 е способен да потисне експресията на провъзпалителни гени в тези клетки. В сравнение с групата, третирана само с *L. rhamnosus* GR-1, ефектът е бил значително по-силно изразен (Liu, Feng et al. 2022). В контекста на ендометриалните клетки, отсъствието на *L. rhamnosus* GR-1 може да повиши риска от възпалителни заболявания на ендометриума поради липсата на регулация на гени с проинфламаторна функция.

Млечната киселина, като продукт на лактобацилите, е доказан имунен модулатор, който действа на различни нива в имунния отговор (Li, Zang et al. 2020). При ниско pH, L-млечната киселина инхибира производството на провъзпалителни цитокини и хемокини, индуцирани от TLRs в цервикални и вагинални епителни клетки (Delgado-Diaz, Tyssen et al. 2020). Млечната киселина може да индуцира секрецията на противовъзпалителния IL-10, да намали производството на провъзпалителния IL-12 в DCs и да намали цитотоксичността на NK-клетките (Ilhan, Łaniewski et al. 2019). Органичните киселини, които са част от микробиома увеличават производството на IL-

1RA, инхибират сигнала на IL-1 и понижават секрецията на IL-6 и MIP-3 α (Delgado-Diaz, Tyssen et al. 2020). Следователно, взаимодействието между микроорганизмите, техните метаболити и имунните компоненти в репродуктивния тракт е много важно за поддържане на репродуктивното здраве.

Сравнението на клетките показва значително по-високи нива на неутрофили ($p = 0.012$) в биопсиите от групата с нарушена микробиота (група C) спрямо групата с нормална ЕМ. Тези резултати съответстват на получените от предходни проучвания, които демонстрират значително по-нисък процент на ендометриални неутрофили от ендометриум с нормална микробиота в сравнение с неутрофилите от проби с нарушена ЕМ (Franasiak, Werner et al. 2016, Baker, Chase et al. 2018, Benner, Ferwerda et al. 2018). Неутрофилите представляват част от вродената имунна защита и участват във възпалението. Доказано е, че пептидогликанът на бактериалната клетъчна стена е от съществено значение не само за оцеляването на бактериите, но също за активиране на възпалението, като влияе на функцията на неутрофилите и на вродения имунен отговор (Li, Zang et al. 2020). Освен това, нарушението на епителната бариера и присъствието на патогенни бактерии води до увеличаване на неутрофилите и има за цел да засили вродената имунна защита на лигавицата (Reis Machado, da Silva et al. 2014). Следователно, в група C доминират механизмите на вродения имунитет чрез повишение на неутрофилите.

Липсата на статистически значима разлика за неутрофилите в група D, спрямо останалите групи, въпреки че има значително нарушена ЕМ може да бъде свързано с динамиката на имунната активация, свързана с пониженото количество на лактобацили и състава на дисбиотичните микроорганизми.

Сравнителният анализ показва, че групата с ниска биомаса (група B) има значително по-висок дял на Т-лимфоцити, в сравнение с групата с нормална микробиота и всички останали групи. В предишните изследвания се доказва, че *Lactobacillus* spp. играят критична роля в регулирането на имунния отговор и предпазването от инфекции. В настоящото изследване, липсата на *Lactobacillus* spp. е свързана с по-висок дял на Т-лимфоцити, което може да обясни повишената имунна активност, наблюдавана при жени с нарушен вагинален микробиом и по-висок риск от инфекция с HIV (Martin, Richardson et al. 1999, van de Wijgert, Morrison et al. 2008, Petrova, van den Broek et al. 2013, Borgdorff, Tsivtsivadze et al. 2014, Stapleton 2016). Липсата им може да доведе до по-висок дял на Т-лимфоцити, което увеличава риска от подобни инфекции или възпалителни състояния. Тези резултати потвърждават ролята на *Lactobacillus* spp. в регулирането на Т-лимфоцитите.

Подобни резултати са получени в проучване, използващо флоуцитометричен анализ на проби от матката на мишки. След третиране с лактобацили, пробите показват значително намаляване на CD8⁺ Т-лимфоцити (Silvia Ventimiglia, Jimena Valeff et al. 2021). Възможно е това да се дължи на кръстосано взаимодействие между uNK-клетки, децидуални макрофаги, uNK-клетки и Т-лимфоцити (Vacca, Cantoni et al. 2010). Връзката между uNK-клетки и Т-лимфоцитите има съществена роля в този контекст. Утеринните NK-клетки са известни със способността си да регулират имунния отговор, включително активността на Т-лимфоцитите. При липса на лактобацили, участващи в баланса на ендометриалната микросреда, uNK-клетки могат да повлияят на активността

на Т-лимфоцитите чрез секреция на галектин и гликоделин, увеличавайки техния процент (D'Ippolito, Di Nicuolo et al. 2018).

Утеринните NK-клетки играят важна роля в регулацията на имплантацията на ембриона и модулирането на толерантен имунен отговор в ендометриума. Те се различават от кръвните NK-клетки по понижената си цитотоксична активност, имат по-малък брой рецептори за активиране и по-голям брой рецептори за инхибиране. Експресират селективно галектин-1 и гликоделин, молекули с имуномодулираща активност. Галектинът потиска пролиферацията и преживяемостта на Т-лимфоцитите, понижава продукцията им на TNF- α , IL-2, IFN- γ и потиска секрецията на IL-12 от макрофагите. Гликоделинът, от своя страна, понижава активирането на Т-лимфоцитите (D'Ippolito, Di Nicuolo et al. 2018).

В заключение, сравнителният анализ на ендометриалните клетки между четирите групи според нарушението на ендометриалната микробиота показва, че нарушенията в микробиотата са свързани с промени в имунната реакция и възпалението в ендометриума. Тези резултати трябва да бъдат взети предвид при разработването на стратегии за диагностика и лечение на нарушенията на ендометриалната микробиота.

Въпреки, че не се наблюдава статистически значима разлика в профила на микроорганизмите между Група С и Група D, в Група С най-многобройни са биопсиите с микробен профил, който включва комбинация от аеробни (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp.) и анаеробни бактерии (*G. vaginalis*, *P. 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., *A. vaginae*) и *Candida* spp. В Група D преобладават биопсиите с микробен профил, който включва комбинацията от анаеробни бактерии и *Candida* spp. Необходими са допълнителни проучвания, за да се докаже дали разликата в микробния профил между двете групи е свързана със значително по-ниски средни процентни стойности на uNK-клетки и Т-лимфоцити в Група С спрямо Група D.

Случаите от Група С имат най-ниска честота на потвърждаване чрез молекулярно-генетичният анализ. ова налага въпроса за причините, довели до толкова ниска честота. Балансираната ендометриална микробиота обикновено функционира като защитна бариера, като произвежда вещества, които възпрепятстват прикрепването и размножаването на патогенни микроорганизми. При наличието на такива микроорганизми тя може да иницира динамичен защитен имунен отговор, като произвежда възпалителни цитокини, хемокини и антибактериални вещества (Zhu, Yang et al. 2022).

В Група С, 11 от 25 биопсии показват по-висок процент на неутрофилите от средния за групата, докато само една биопсия показва увеличение на плазматичните клетки. Подобно на това, в Група D, 30 от 77 биопсии показват по-висок процент на неутрофилите от средния процент за групата, но само в две от тях има увеличени плазматични клетки. Данните от предишни изследвания показват, че хроничният ендометрит не е свързан с наличието на патогени, произхождащи от горните генитални пътища. Тези резултати съвпадат с наблюдението, че повишеното присъствие на неутрофили не винаги е съпроводено от увеличен брой плазматични клетки, което

предполага различни механизми на възпалителния отговор. Освен това, липсата на корелация между хроничния ендометрит и патогените от горните генитални пътища предполага, че други фактори, освен микробната флора, могат да играят роля в развитието на този вид възпаление (Haggerty, Hillier et al. 2004).

Неутрофилите са основните клетки, участващи в острия възпалителен отговор, и са едни от първите, които се мобилизират при бактериални инфекции. Високите нива на неутрофили при биопсиите от двете групи потвърждават наличие на бактериална инфекция или остър възпалителен процес. От друга страна, плазматичните клетки се увеличават по време на хронични възпалителни процеси и при наличието на антигени, които предизвикват хуморален имунен отговор.

Възможно е наблюдаваните различия между групите да се дължат на различна фаза на имунния отговор в момента на биопсията. В острата фаза на инфекцията, доминиращи в мястото на възпалението са неутрофилите, които са характерни за вродния имунен отговор. Ако в изследваните групи преобладават биопсии от ранни етапи на възпалението, това би обяснило високия процент на неутрофили. От друга страна, плазматичните клетки са типични за хуморалния имунен отговор и тяхното появяване в ендометриума е свързано с по-късните етапи на възпалителния процес. Малкият брой биопсии с повишен брой плазматични клетки може да отразява по-скоро хронична фаза на възпалението или индивидуални различия в имунния отговор. Важно е да се отбележи, че в един възпалителен процес могат да съществуват едновременно различни фази, което затруднява интерпретацията на резултатите от биопсиите, взети в различни моменти от време.

Диагностиката на хроничен ендометрит придобива все по-голямо значение през последните години. Голямо внимание се обръща на този предполагаем аспект при безплодие. В Австрия, Германия и Швейцария диагностиката и терапията на хроничен ендометрит е включена в действащото ръководство за повтарящи се спонтанни аборти (Hennessy, Dennehy et al. 2021). Хроничният ендометрит е дефиниран като хронично възпалително заболяване, характеризиращо се с инфилтрация на плазматични клетки в областта на ендометриалната строма (ESPC). Въпреки че ендометриалните плазматични клетки се считат за важен диагностичен критерий за хроничен ендометрит, проучванията показват, че те не са специфични само за тази патология. Присъстват при хормонално обусловени ендометриални нарушения във връзка с промени в структурата на жлезата (нарушен пролиферативен и ановулаторен модел) и процеси на разкъсване на стромата (Espinos, Fabregues et al. 2021).

Чрез културелно изследване и конвенционален PCR на ендометриална тъкан Kitaya и сътр. не успяват да открият микроорганизми при повече от половината безплодни жени с хроничен ендометрит (Kitaya, Matsubayashi et al. 2017), като същевременно при жените със и без хроничен ендометрит са докладвани сходни нива на патогенни микроорганизми (Moreno, Codoñer et al. 2016). По подобен начин в настоящото проучване в Група А се установява значително по-висок среден ранг на плазматичните клетки отколкото този в Група В. Следователно, отсъствието на дисбиотични микроорганизми не е достатъчно условие за изключване на хроничен ендометрит, характеризиращ се с наличието на плазматични клетки. Обратно, наличието на

дисбиоза в Група С и Група D не означава, че броят на плазматичните клетки ще е повишен.

Имунологичната оценка на етиологичните фактори при репродуктивните нарушения трябва да включва изследване на допълнителни фактори и компоненти, които могат да участват в етиологията на хроничния ендометрит, като вируси, автоимунни фактори или нарушения в регулацията на вродения имунен отговор. Освен това, както вродените, така и адаптивните имунни пътища могат да бъдат независимо ангажирани при условия на дисбиоза и остър или хроничен ендометрит. Причинно-следствената връзка между хроничния ендометрит и дисбиозата остава неясна – не е сигурно дали нерегулираният имунен отговор в ендометриума води до по-висока честота на дисбиоза или дисбиозата е причина за хроничния ендометрит.

Две проучвания установяват, че разпространението на хроничен ендометрит е с честота съответно 13% при жени с RPL (Kitaya 2011) и 30% при жени с RIF (Johnston-MacAnanny, Hartnett et al. 2010). В настоящото проучване биопсиите, при които се доказват над 5% плазматични клетки от лимфоцитите се доказват при 27.1% от жените с RIF и при 31.18% от жените с RPL, но средната процентна стойност на ендометриалните плазматични клетки при жените с RIF е по-висока от същата при жените с RPL. Тези резултати потвърждават, че хроничният ендометрит е значим фактор при жените с RPL и RIF, като честотата му е сравнително висока и в двете групи. Интересно е да се отбележи, че макар честотата му да е по-висока при RPL, тежестта на състоянието може да бъде по-изразено при RIF. Разликата в средната процентна стойност на плазматичните клетки може да отразява различни патофизиологични механизми при RPL и RIF. Например, при RPL може възпалението да е по-често срещано, но да е с по-ниска интензивност, докато при RIF възпалението може да бъде по-рядко, но по-изразено. Това предполага необходимостта от диференциран подход при диагностика и лечение на хроничен ендометрит в зависимост от конкретния репродуктивен проблем. От една страна, по-високите средни процентни стойности на плазматични клетки при RIF могат да изискват по-интензивно лечение на възпалението, докато при RPL по-важно е прилагане на по-широкото скринингово покритие.

В сравнение с Група С (нарушена микробиота), групата със значително нарушена микробиота (Група D) има значително по-високи нива на лимфоцити и uNK-клетки. Подобни данни са документирани, като е установена значителна положителна корелация между uNK-клетки и *Sphingomonas* (Chen, Chen et al. 2021). Така се потвърждава динамичността на имунната реакция, която е свързана със значителното нарушение на микробиотата. Този резултат показва, че е необходимо да се направи разграничение на субпопулациите на uNK-клетки според тяхната функционална характеристика.

4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИМУННИТЕ КЛЕТКИ В ЕНДОМЕТРИУМ ОТ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НАРУШЕНИЯ В ГРУПИТЕ СПОРЕД ПРОФИЛА НА ЕМ

Молекулярно-диагностичният метод за анализ на ендометриалната микробиота в това проучване групира бактериите според различните изисквания към атмосферата за своето развитие. Това позволява да се извърши групиране на биопсиите, според състава на микроорганизмите в девет различни групи и да се направи анализ на състава на имунните клетки в различните групи. Анализът на ендометриалните клетки между групите показва някои статистически значими разлики, което показва важноста на микроорганизмовите съобщества за имунния отговор.

Известно е, че някои бактериални общности са способни да формират структури, наречени бактериален биофилм. Тези биофилми представляват плътно прикрепени към инертна повърхност или биологична тъкан общности от бактерии, обградени от слузеста субстанция, наречена EPS. Тя е изградена от извънклетъчни полимерни вещества, които осигуряват структурна цялост на биофилма и защитават бактериите от неблагоприятни условия (Costerton, Stewart et al. 1999). Тази общност често се характеризира със сложна вътрешна архитектура и съдържа канали, позволяващи циркулацията на хранителни вещества (de Beer, Stoodley et al. 1994). Отделни области в биофилма могат да съдържат генетично идентични клетки, които проявяват различни модели на генна експресия (Costerton, Lewandowski et al. 1995). Това води до повишена толерантност към неблагоприятни условия и по-добра устойчивост във враждебна среда, като осигурява защита срещу химическа дезинфекция, антимикробно лечение и човешки имунни реакции (Costerton, Stewart et al. 1999).

Значително по-високият брой на левкоцити в група 3, според микробния профил, спрямо групите 2, 4, 5, 6 и 7 подчертава важноста на микроорганизмовите съобщества в контекста на имунния отговор. Липсват аналогични данни в научната литература, но това не противоречи на наблюденията до момента. Известно е, че аеробните микроорганизми могат да създадат микросреда, която поддържа анаеробните микроорганизми (Percival, Malone et al. 2018). Поради малкия брой случаи в Група 3, според микробния профил, не могат да се направят обобщени заключения.

Значителната разлика в броя на левкоцитите между Група 5 и Група 8 показва, че някои видове микроорганизми предизвикват по-силен възпалителен отговор от други. Това може да се дължи на различни вирулентни фактори на микроорганизмите или на различни механизми, чрез които те взаимодействат с имунната система на гостоприемника.

Изследвания, използващи сензори за проследяване на кислородни концентрации, показват, че биофилмите на *C. albicans* създават значителен градиент на концентрация на кислорода. Нивата на кислорода намаляват от околната среда в горната част на биофилма до много ниски нива в долната му част. Този градиент остава постоянен, независимо дали *C. albicans* се отглежда самостоятелно или в комбинация с анаеробни бактерии като *C. perfringens* или *B. fragilis* (Fox, Cowley et al. 2014). Биофилмите на *C. albicans* създават локално хипоксични условия, които могат да благоприятстват растежа на анаеробните бактерии. В анализираните 9 групи се наблюдава, че

комбинацията на *Candida* spp. и анаеробни микроорганизми се среща с най-висока честота.

Епителните клетки са първа линия на защитата на женския генитален тракт (Czechowicz, Nowicka et al. 2022). Това определя локалния имунитет, а не системният, като критичен за защитата на домакина срещу инфекцията. Повърхността им е покрита с PRR, отговорни за разпознаването на гъбички от рода *Candida*. Множество изследвания подчертават, че епителните клетки са способни да разграничават и категоризират гъбичките върху вагиналната лигавица, определяйки ги като коменсални или патогенни.

Проучванията, които са свързани с патогенността на *Candida* spp. и имунният отговор са фокусирани основно върху вагиналната кандидоза. Заедно с имунния отговор на гостоприемника, факторите на вирулентност на *C. albicans*, особено хифите и Candidalysin, са ключови за развитието на вагинална кандидоза (Peters, Palmer et al. 2014). Способността на *C. albicans* да се трансформира в хифи е от съществено значение за патогенезата, както и за вагиналната миграция на полиморфонуклеарните левкоцити. Candidalysin представлява секретирани цитолитичен пептиден токсин, чиито гени са сред най-силно експресирани при вагинит и е от съществено значение за имунопатогенния отговор.

При разпознаване на патогенни гъбички, епителните клетки активират анексин A1, S100 алармини и IL-1 в отговор на *Candida* чрез TLR4 и SIGIRR1 и инфлазама NLRP3 (Roselletti, Perito et al. 2019). Възпалителният отговор при вагинална кандидоза е зависим от праговото ниво на *Candida* и реакцията на епителните клетки. Чувствителните жени реагират с възпаление на ниски нива на *Candida*, докато резистентните жени - не. При чувствителни жени, *Candida* стимулира епителните клетки да произвеждат алармини и провъзпалителни цитокини, за да привлекат неутрофили. При резистентни жени, епителните клетки не произвеждат алармини/цитокини, а вместо това взаимодействат с анексин A1, потискайки растежа на *Candida* (Yano, Peters et al. 2018).

Настоящото изследване открива, че присъствието на *Candida* spp. в ендометриума (Група 4) е свързано с противоположни промени в броя на левкоцитите и лимфоцитите. Значително по-ниското средно количество на левкоцити в сравнение с Група 3 предполага, че присъствието на *Candida* spp. може да потиска левкоцитната активност в ендометриума. От друга страна Група 4 има по-високо средно количество лимфоцити (55.27%) в сравнение с Група 5 (39.04%, $p = 0.040$), Група 6 (38.37%, $p = 0.010$) и Група 9 (39.80%, $p = 0.005$). Тези открития не противоречат на данните до момента за предизвикваната неутрофилна анергия от различни патогени и възпалителни състояния (Yano and Fidel Jr 2022).

Средното количество на Т-лимфоцитите в Група 4 е значително по-ниско в сравнение с Група 7, което предполага, че самостоятелното присъствие на *Candida* spp. в ендометриума не предизвиква Т-клетъчен отговор и подкрепя значението на вродената имунна защита (Czechowicz, Nowicka et al. 2022).

Съответстващо на резултатите за Т-лимфоцитите, анализът на плазматичните клетки показва, че Група 4 (с *Candida* spp.) има значително по-ниски средни процентни

стойности в сравнение с Група 3 (без *Candida* spp.). Това потвърждава ключовата роля на вродения имунен отговор при инфекции с *Candida* spp. (Peters, Palmer et al. 2014).

В настоящото проучване се доказва, че броят на uNK-клетки е значимо по-нисък в Група 2 в сравнение с Група 4 (Таблица 3). Освен това, броят на uNK-клетки е значимо по-висок в Група 4 в сравнение с Група 6 и Група 8. Статистически значими разлики не се наблюдават в броя на uNK-клетки между останалите групи.

Тези резултати предполагат, че броят на uNK-клетки може да варира значително между различните групи, като най-високите нива се наблюдават в Група 4, а най-ниските - в Група 2. Утеринните NK-клетки са важен компонент на имунната система в ендометриума и могат да играят роля в имплантацията на ембриона и развитието на бременността. По подобен начин Matteo и съавт. наблюдават, че безплодни жени с хроничен ендометрит имат понижен процент на uNK-клетки и Т-лимфоцити в сравнение с жените с необяснимо безплодие (Matteo, Cicinelli et al. 2009). Въпреки че са проведени множество изследвания за влиянието на *Candida* spp. върху имунната система, липсва задълбочен анализ, фокусиран върху сравнението на uNK-клетки в ендометриума при пациенти с и без *Candida* spp. инфекция. Необходими са допълнителни изследвания, за да се установи значението на тези наблюдения и да се определи, дали разликата в броя на uNK-клетки може да бъде свързана с репродуктивния изход.

Настоящият анализ сравнява броя на плазматичните клетки в девет групи, за да се проучи имунния отговор при различните групи. Наблюдаваните по-високи средни процентни стойности на плазматичните клетки в Група 3 и по-ниският брой плазматични клетки в Група 9 потвърждават резултатите от подобно проучване, което показва, че *Lactobacillus* spp. е по-разпространен в микробиотата на жените без хроничен ендометрит (Liu, Ko et al. 2019). Липсата на статистическа значимост между групите може да се обясни с малкия брой на случаите в някои от тях.

Проведената терапия води до намаляване на плазматичните клетки (под 5% от лимфоцитите) при 63% от жените с хроничен ендометрит. Това подобрение е свързано с 20% увеличение на честотата на живородени деца. Проучване, обхващало 95 жени, показва, че 56,8% от тях имат хроничен ендометрит. След антибиотично лечение, 82,3% от пациентките са излекувани, докато при 17,6% заболяването персистира. Жените с успешно излекуван хроничен ендометрит имат значително по-висока честота на забременяване и раждане в сравнение с тези, при които заболяването продължава, както и с жените без тази диагноза (Cicinelli, Matteo et al. 2018).

Въпреки разликите в дизайна на двете проучвания, резултатите са сходни. И двете показват, че ендометритът може да повлияе негативно върху успеха от ART, и че лечението му може да подобри репродуктивните резултати.

Настоящият анализ потвърждава тези констатации и резултатите от предишно проучване върху 80 жени, подложени на IVF. Резултатите от настоящото проучване, подобно на предишното, не показват значима връзка между броя на плазматичните клетки и успешната бременност (Herlihy, Klimczak et al. 2022).

5. ОБСЪЖДАНЕ НА КОРЕЛАЦИИТЕ В ГРУПИТЕ С RIF И RPL

Резултатите от корелационния анализ на имунните клетки при жени с RIF и RPL показват сходствата и разликите във взаимодействието между различните типове клетки в двете групи. По отношение на сходствата, се наблюдава, че при жените от двете групи има силна положителна корелация между броя на левкоцитите и лимфоцитите и слаба, но значима положителна корелация между броя на левкоцитите и плазматичните клетки. Също така се наблюдава силна отрицателна корелация между броя на макрофагите и неутрофилите.

При жените с RIF и RPL се наблюдават разлики във взаимодействията между имунните клетки. В случаите с RIF, броят на левкоцитите е обратно пропорционален на броя на CD34+ uNK-клетки. Такава зависимост не се наблюдава при RPL. Подобна е ситуацията и с лимфоцитите: при RIF, с повишение на стойностите на лимфоцитите намаляват стойностите на CD34+ uNK-клетки. При RPL тази връзка е по-слаба. Тези разлики предполагат, че имунната регулация при RIF и RPL протича по различен начин. Подобни резултати са получени в изследване, което включва жени с безплодие. Пробите от ендометриума на 58 жени са взети по време на оперативна интервенция за диагностика на ендометриоза. След средно 9,5 месеца от операцията 33 от тях са преминали през APT (IVF, ICSI или IUI). Утеринните NK-клетки и хемопоеичните прогениторни клетки от ендометриума са анализирани чрез флоуцитометрия. При жени с успешна имплантация популациите на ендометриални CD34+ клетки са по-високи (3,97% срещу 0,69%; $P < 0,0004$), а коекспресията на маркера за NK-клетки CD56 е повишена (81,1% срещу 60,9%; $P < 0,034$) в сравнение с пациентките, при които имплантацията не е била успешна (Glover, Crosby et al. 2018).

Намаляването на броя на CD34+ uNK-клетки или дисбалансът между CD34+ uNK-клетките и uNK-клетки при RIF би могло да доведе до нарушена ангиогенеза и ремоделиране на маточно-плацентарните артерии, което е ключов фактор за успешна плацентация.

В настоящото проучване се открива слаба, но значима положителна корелация между броя на лимфоцитите и uNK-клетки при жени с RPL, докато при жени с RIF такава корелация липсва. Резултатите от друго проучване показват силна положителна корелация между CD45+ левкоцити и uNK-клетки в контролната група, но не са открити корелации в групите с RPL (Chiokadze, Bär et al. 2020).

И в двете проучвания се наблюдава корелация между броя на лимфоцитите или CD45+ левкоцитите и броя на uNK-клетки или CD56+ клетките, но корелацията е по-силна в сравнение с тази в настоящото. Освен това, корелацията е налична само в контролната група в другото проучване, докато в настоящото проучване е налична само при жени с RPL. Възможно е жените, включени в двете проучвания, да са имали различни характеристики, които са повлияли на корелационните връзки между лимфоцитите и uNK-клетки. Друга разлика е използвания имунохистохимичен метод за анализ на имунните клетки.

Резултатите от двете проучвания показват, че взаимоотношенията между лимфоцитите и uNK-клетки са сложни и могат да се различават при жени с RPL и RIF.

Необходими са допълнителни изследвания, за да се разберат по-добре тези взаимоотношения и тяхната роля в репродуктивните нарушения.

Клиничното значение на количеството и функцията на uNK-клетки за безплодието и неблагоприятните резултати от бременността остава спорно в научната литература. Някои изследвания показват понижаване на броя на uNK-клетки в ендометриалните биопсии, взети в секреторната фаза при жени с безплодие (Klentzeris, Bulmer et al. 1992, Kofod, Lindhard et al. 2017), както и намаляване на uNK-клетки при жени, претърпели спонтанен аборт след АРТ, в сравнение с тези, които са имали успешно живо раждане след АРТ (Fukui, Fujii et al. 1999). В други проучвания не се открива разлика в изобилието на uNK-клетки (McGrath, Ryan et al. 2009, Giuliani, Parkin et al. 2014) или дори е отчетено увеличение на прогениторни uNK-клетки в ендометриума на безплодни жени, в биопсии, взети по време на планова операция (Lynch, Golden-Mason et al. 2007).

6. ОБСЪЖДАНЕ НА КОРЕЛАЦИИТЕ МЕЖДУ ИМУННИТЕ КЛЕТКИ В ЧЕТИРИТЕ ГРУПИ НА ЕМ

Резултатите от корелационния анализ по Пиърсън, представен в Таблица 7, показват статистически значими връзки между нивата на ендометриалните имунни клетки в различните групи, категоризирани по ЕМ. Тези данни не противоречат на друго проучване при жени с репродуктивни проблеми и хроничен ендометрит, където се наблюдават промени в транскрипционното регулиране на цитокини, растежни фактори и апоптотичните протеини (Di Pietro, Cicinelli et al. 2013). Промените във възпалителния отговор, могат да доведат до динамика в нивата на ендометриалните имунни клетки. Липсва противаречие с литературните данни, които показват, че в засегнатият от хроничен ендометрит ендометриум се открива нарушен модел на лимфоцитните субпопулации, свързано с аберантна локална микросреда и променена секреция на паракринни фактори.

Резултатите от това проучване не противоречат на предишно, което показва, че изолирането на ендометриални микроорганизми не е задължително да корелира с ендометриално възпаление (Vitagliano, Noventa et al. 2017).

Въз основа на тези резултати може да се предположи, че промените в нивата на ендометриалните имунни клетки могат да бъдат полезен биомаркер за оценка на конкретното имунобиологично нарушение.

7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ АНАЛИЗА НА ЕНДОМЕТРИАЛНИТЕ ИМУННИ КЛЕТКИ ПРЕДИ И СЛЕД ПРОВЕДЕНА АНТИБИОТИЧНА И ПРОБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ

Настоящото проучване, макар и с ограничена извадка, предполага, че антибиотичната и пробиотичната терапия може да повлияе положително на броя на uNK-клетки. Тези данни са в съответствие с предходно изследване, което свързва дисбаланса на микробиома на ендометриума с промени в имунната система, включително нарушена диференциация на uNK-клетки (Al-Nasiry, Ambrosino et al. 2020). Тези открития са важни, тъй като предполагат, че модулирането на микробиома

на ендометриума може да бъде потенциална терапевтична стратегия за подобряване на функцията на uNK-клетките и евентуално за подобряване на репродуктивните резултати.

Въпреки това, интерпретацията на резултатите от тези проучвания е усложнена от факта, че оценката на uNK-клетки като диагностичен инструмент е затруднена от липсата на единни референтни стойности. Проучване, което включва 215 жени, показва значителни разлики в средните проценти на uNK клетки: 2,5% при фертилни жени, 3,2% при жени с повтарящи се спонтанни аборти (RM) и 3,1% при жени с повтарящи се неуспехи при имплантация (RIF) (Chen, Mariee et al. 2017). Тези данни подчертават сложността на интерпретацията на нивата на uNK-клетките и необходимостта от стандартизиране на методите за тяхното измерване и оценка.

Интересно е, че при определяне на долна граница от 1,2%, 16% от жените с RM и 18% с RIF са имали нива на uNK клетки под тази стойност (Chen, Mariee et al. 2017). Този факт повдига въпроса за възможните вредни ефекти от ниските нива на uNK-клетки върху ендометриума, което е област, която до голяма степен е пренебрегвана от изследователите. Повечето проучвания се фокусират върху оценката на по-високи нива на uNK клетки, без да обръщат внимание на по-ниските нива, което води до ограничен брой проучвания в тази област.

В допълнение към тези предизвикателства, друго проучване установява, че при 53% от жените с идиопатичен RIF броят на CD56+ NK-клетките е над 250 на зрително поле при увеличение 400 пъти, докато при контролна група жени без RIF, този брой е бил едва 5% (Santillán, Lozano et al. 2015). Тези резултати предполагат, че повишеният брой NK-клетки в ендометриума може да играе роля в развитието на RIF, но механизмът, по който това се случва, все още не е напълно изяснен.

В заключение, сравнителният анализ на ендометриалните имунни клетки преди и след антибиотична и пробиотична терапия, както и изследванията върху uNK-клетки при жени с репродуктивни проблеми, предоставят важна информация за потенциални терапевтични стратегии. Въпреки че са необходими още изследвания, тези открития могат да доведат до разработването на нови методи за диагностика и лечение на репродуктивни нарушения, както и до подобряване на репродуктивното здраве на жените.

8. ОБСЪЖДАНЕ НА РАЖДАЕМОСТТА СЛЕД ПЪРВАТА ART ПРОЦЕДУРА ОТ ПРОВЕДЕНАТА АНТИБИОТИЧНА И ПРОБИОТИЧНА ТЕРАПИЯ

Резултатите от настоящото проучване показват връзка между нарушенията на ендометриалната микробиота и репродуктивния резултат. Те са в съгласие с данните, представени от Морено и сътр. (Moreno, Garcia-Grau et al. 2022). Тяхното изследване подчертава значението на балансирания състав на ендометриалната микробиота за успешната репродуктивна функция, или по-конкретно, че наличието на патогенни бактерии като *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* в ендометриума, съчетано с намалено количество *Lactobacillus spp.*, е свързано с нарушена репродуктивна функция.

Тези открития подкрепят хипотезата, че ендометриалната дисбиоза може да бъде важен фактор за неуспешна имплантация и/или загуба на бременност.

Нашите резултати, показващи по-ниска честота на раждания при пациентки с нарушена ендометриална микробиота (Групи В, С и D) в сравнение с тези с нормална микробиота (Група А), са в съответствие с констатациите на Морено и сътр. Това подсилва идеята, че дисбалансът в състава на ендометриалната микробиота може да има негативен ефект върху репродуктивния резултат.

Punzon-Jimenez и сътр. се фокусират върху ролята на *Lactobacillus spp.*, като установяват, че богатите на *Lactobacillus* вагинални и ендометриални микробни профили са свързани с по-добри репродуктивни резултати (Punzón-Jiménez and Labarta 2021). Това подчертава значението не само на отсъствието на патогени, но и на наличието на достатъчно количество *Lactobacillus* за поддържане на здрава репродуктивна среда. Настоящото проучване, чрез използването на антибиотична и пробиотична терапия, цели именно възстановяване на баланса на микробиотата, включително и на *Lactobacillus spp.*, което може да обясни подобрението (макар и не при всички) на репродуктивните резултати.

Важно е да се отбележи, че проучването на Морено и сътр. се фокусира върху идентифицирането на конкретни патогенни бактерии, свързани с репродуктивни проблеми, докато настоящото проучване оценява общото състояние на ендометриалната микробиота и ефекта от нейната корекция чрез антибиотична и пробиотична терапия върху локалната имунна среда. Въпреки тези разлики в подхода, и двете проучвания подчертават значението на поддържането на балансирана ендометриална микробиота за успешната бременност.

VII. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Нормалната ендометриална микробиота, характеризираща се с *Lactobacillus* spp., е важна за ефективната имплантация на бластоцистите.
2. Намаленото количество или липсата на лактобацили може да доведе до локално възпаление, както и до количествени промени в разпределението на имунните клетки, включително на uNK-клетки, Т-лимфоцити и неутрофили.
3. Дисбиозата на ендометриалната микробиота може да е част от патогенетичен механизъм в основата на RIF и RPL.
4. Високите нива на левкоцити и лимфоцити в Група В (с ниска биомаса) в сравнение с Група С (с умерена дисбиоза) свидетелстват за възпаление, подчертавайки значението на лактобацилите за установяване на локална имунна хомеостаза.
5. Липсата на лактобацили може да доведе до повишено локално възпаление, както и до количествени промени в ендометриалните имунните клетки, включително uNK-клетки, Т-лимфоцити и неутрофили.
6. Пробиотиците могат да модулират ендометриалната микробиота и да бъдат нова терапевтична стратегия в лечението на RIF и RPL.

viii. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. Разработена е методика за флуоцитометрично определяне на ендометриални лимфоцитни популации чрез анализ на ендометриални биопсии по време на имплантационния прозорец в лутеалната фаза при жени с репродуктивно нарушение.
2. За първи път в България е приложен комплексен подход за изследване на ендометриални биопсии, комбиниращ молекулярно-генетичен и флуоцитометричен анализ.
3. За първи път в България е анализирано влиянието на ендометриалната микробиота върху локалния имунен отговор чрез разликите в имунните клетки между групите с различен състав на микробиотата при жени с RIF и RPL.
4. За първи път в настоящото проучване е използван метод за групиране на ендометриални биопсии въз основа на състава на микробиотата.
5. За първи път в България е извършено проучване, което оценява патогените от горните генитални пътища и тяхната роля за хроничния ендометрит и ендометриалната дисбиоза при жени с RIF и RPL.

Приноси с потвърдителен характер

1. Средните процентни стойности на левкоцитите, наблюдавани в биопсиите, съответстват на данни от предходни проучвания, доказващи валидността на процедурата за вземане на проби и обработка.
2. Потвърждава се повишената честота на дисбиоза и хроничен ендометрит при жени с RPL и RIF.
3. Потвърждава се влиянието на ендометриалната микробиота върху репродуктивните резултати.
4. Потвърждава се, че ендометриалната микробиота, доминирана от *Lactobacillus* spp., е съществена за оптималната имплантация.
5. Потвърждава се ролята на неутрофилите в ендометриалният имунен отговор при случаите с ендометриална дисбиоза.
6. Потвърждава се терапевтичният ефект на антибиотичната терапия върху хроничния ендометрит и репродуктивния изход.

IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Списък на научните публикации във връзка с дисертацията

- 1.1. Ivanov P., Lukanov T., Konova E., **Blazheva S.**, Rilcheva V., Tsvyatkovska T., Kovacheva K. *Activation of peripheral natural killer cells in women with repeated early pregnancy loss*. Akusherstvo i ginekologia, 2015, 54(8): 3-7; ISSN: 0324-0959; Web of Science, Scopus
- 1.2. **Blazheva S.**, Pachkova S., Bodurska T., Ivanov P., Blazhev A., Lukanov T., Konova E. *Unlocking the Uterine Code: Microbiota, Immune Cells, and Therapy for Recurrent Reproductive Failure*. Microorganisms, 2024, 12(3): Article number 547; e-ISSN: 2076-2607; Web of Science, Scopus
- 1.3. Pachkova S., Gincheva D., **Blazheva S.**, Konova E. *Frequency of urogenital mycoplasmas in women with reproductive problems*. Akusherstvo i ginekologia, 2019, 58(3): 18-22; ISSN: 0324-0959
- 1.4. **Blazheva S.**, Bodurska T., Ivanov P., Pachkova S., Konova E. *Endometrial immune cells and endometrial microbiome in women with recurrent implantation failure*. Bulgarian Journal of Clinical Immunology, 2022, 15(1): 3-12; ISSN: 2738-7046

2. Списък на участията в научни конференции във връзка с дисертацията

2.1. Участия в научни форуми в България

- 2.1.1. **Blazheva S.**, Bodurska T., Ivanova S., Ivanov P., Konova E. *Research of the endometrial immune cells in women with reproductive failure and impaired endometrial microbiota*. 4th International World of Microbiome Conference. 26 – 28.10.2023, Sofia.
- 2.1.2. **Блажева С.**, Бодурска Т, Иванов П, Пачкова С, Конова Е. *Проучване на ендометриалните имунни клетки при жени с нарушен ендометриален микробиом и репродуктивни неуспехи*. XXIV Конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве, 06 – 09.04.2023 г., к.к. Боровец.
- 2.1.3. Бодурска Т., **Блажева С.**, Иванова С., Конова Е., Тотев Т. *Пилотни данни от изследване на ендометриален микробиом при пациентки с повтарящи се репродуктивни неуспехи*. XXIV Национален конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве с международно участие, 06 – 09.04.2023 г., к.к. Боровец.
- 2.1.4. **Блажева С.**, Пачкова С., Иванов П., Бодурска Т., Конова Е. *Влияние на ендометриалния микробиом върху ендометриалните имунни клетки при жени с репродуктивни неуспехи*. Годишна научна конференция по имунология, 16.12.2022 г., гр. София.
- 2.1.5. Пачкова С., **Блажева С.**, Иванов П., Бодурска Т., Конова Е. *Ендометриален микробиом при жени с репродуктивни проблеми*. XX Юбилеен Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции на БАМ, 16 – 18.09.2022 г., гр. Пловдив.
- 2.1.6. **Блажева С.**, Иванова С., Гинчева Д., Иванов П., Бодурска Т., Луканов Ц., Конова Е. *Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалния микробиом при жени с имплантационни неуспехи*.

Юбилейна Конференция по Клинична Имунология, 06 – 07.11.2020 г., гр. София.

2.1.7. **Blazheva S.**, Pachkova S., Gincheva D., Ivanov P., Gencheva I., Lukanov T., Konova E. *Research on herpes virus carrier and local immune response in endometrial biopsy in women with reproductive failure*. Fifth national congress of immunology, 25 – 28.10.2018, Plovdiv.

2.1.8. **Блажева С.**, Пачкова С., Луканов Ц., Конова Е. *Проучване на обща популация NKклетки в периферна кръв при жени с микоплазмена инфекция и репродуктивни неуспехи*. Седма работна среща “Репродуктивна медицина 2017 – противоречия и консенсус“, 28 – 30.04.2017 г., гр. Плевен

2.2. Участия в научни форуми в чужбина

2.2.1. **Blazheva S.**, Bodurska T., Lukanov T., Atanasova M., Kyurkchiev D., Konova E. *Intravenous immunoglobulin therapy for recurrent pregnancy loss in women with high DFS 70 autoantibodies: a case report*. 17 – 20.05.2024 Ljubljana, Slovenia.

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

3. Участия в научни проекти

3.1. №22/2022 Проучване на ендометриалния имунен профил при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи.

3.2. №10/2017 Проучване честотата на носителство на HSV-1,2, CMV и EBV/херпесвируси в ендометриум при жени с неуспешни асистиран репродуктивни техники.

Информационен лист за пациента

Заглавие на проекта:

Проучване на ендометриалния имунен профил при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи

Обяснения и информация за пациента относно същността на проекта:

Уважаема Госпожо,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие, тъй като при вас е диагностициран инфертилитет с неизяснен характер и при проведените асистиранни техники до момента липсва успешна бременност. Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори моля, попълнете формуляра. С това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от лекари от УМБАЛ “Д-р Г. Странски” ЕАД, Медицински център - Клиничен институт за репродуктивна медицина, гр. Плевен и МУ – Плевен. По всички интересувачи Ви въпроси можете да се отнасяте към водещия изследовател Доц. Емилияна Илиева Конова, д.м. телефон _____, e-mail _____

Бихме искали да Ви помолим да участвате в проекта, за да получим отговор на въпроса какво е значението на ендометриалния клетъчен състав за нарушенията в имплантацията. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за лимфоцитите, моноцит-макрофагите и неутрофилите, както и на някои основни лимфоцитни популации като ендометриални НК-клетки, общи Т-лимфоцити, прогениторни НК-клетки. Това би определило по-точно от сега съществуващите методи индивидуалния ендометриален профил, за да се определи най-подходящият лечебен подход към всеки пациент.

Пряката полза за Вас от участието в проекта е, че лично ще Ви бъде предоставена информация за резултата от самото изследване. При необходимост ще Ви бъде предложен алгоритъм за проследяване и лечение, и възможност за консултация с психолог и съответните специалисти.

Проектът ще продължи една година.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно заболяванията, от които страдате сега или сте страдали в миналото, както и някои лични данни - Ваша рождена дата и телефон, за да може да се осъществява контакт с Вас относно получения резултат. Данните ще се нанасят в Карта на пациента – документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, задължително изисквани при болни с инфертилитет, ще бъде необходимо да попълните анкетна карта с няколко въпроса. Вземането на проба за това изследване не крие риск. Извършва се чрез стерилна кюрета от специалист акушер-гинеколог Доц. д-р Петър Иванов или д-р Татяна Бодурска при условия, отговарящи на изискванията определени от стандарта в акушеро-гинекологичната практика.

Не са предвидени средства в проекта за обезпечаване на Вашите транспортни разходи.

Ако решите да участвате, цялата информация от участието Ви в настоящия проект ще остане поверителна и ще бъде съхранявана в МЦ-КИРМ „Света Елисавета“, гр. Плевен. Определени упълномощени лица д-р Светла Огнянова Блажева ще има достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност.

Формуляр за информирано съгласие

Заглавие на проекта:

Проучване на ендометриалния имунен профил при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения (**подчертава се вярното твърдение**).

Бях помолена да се съглася сама Да Не

Прочетох Информационния лист на пациента Да Не

Дадена ми бе възможност да задам всички важни за мен въпроси и да обсъдя този проект Да Не

Получих удовлетворяващи ме отговори на всички мои въпроси Да Не

Получих достатъчна информация относно проекта Да Не

Проектът ми беше обяснен, зададох въпросите си и получих отговори на тях от.....
(име на изследователя)

.....
(Подпис на изследователя)

Разбирам, че съм свободна да се откажа от участие в проекта по всяко време, без да давам обяснения за отказа си и без това да повлияе на полагащите ми се в бъдеще медицински грижи.

Дата:.....

Име, презиме, фамилия на пациента:

.....

Подпис на пациента:.....