

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.14

Адреса для листування: Буковинський державний медичний університет пл. Театральна, 2, Чернівці, Україна, 58000

Е-пошта: kupchanko06@gmail.com

Надійшла до редакції: 07.12.2024

Взята до друку: 20.12.2024

Опублікована: 27.12.2024

ORCID IDs

Оксана Бакун:
<https://orcid.org/0000-0002-4742-2265>

Галина Коваль:
<https://orcid.org/0000-0002-7120-9253>

Наталія Музика:
<https://orcid.org/0000-0002-3381-1163>

Лоуренс ДюБаске:
<https://orcid.org/0000-0001-5013-8022>

Ксенія Слободян:
<https://orcid.org/0000-0001-7872-6731>

Особистий внесок авторів:

Концепція, Результати дослідження:
Оксана Бакун;

Написання статті: Оксана Бакун, Галина Коваль;

Редагування та затвердження остаточного варіанту: Оксана Бакун, Лоуренс ДюБаске, Наталія Музика, Ксенія Слободян.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Дозвіл комісії з питань біоетики: дослідження схвалене Комісією з питань біомедичної етики Буковинського державного медичного університету (протокол схвалення № 8 від 16.05.2024).

Фінансування: автори не отримали жодної фінансової підтримки свого дослідження.



© Всі автори, 2024

Патогенетичне обґрунтування використання пробіотиків у програмах підготовки до допоміжних репродуктивних технологій у жінок з ендометріозом на основі вивчення показників рівня мезотеліну, мРНК IL1 β , HMGB1, NLRP3- INFLAMMASOME

Оксана Бакун¹, Галина Коваль¹, Наталія Музика¹,
Лоуренс ДюБаске^{2,3}, Ксенія Слободян¹

¹Буковинський державний медичний університет,
Чернівці, Україна

²Університетська клініка імені Джорджа Вашингтона,
Вашингтон, США

³Дослідницький Інститут Імунології, Гарднер, США

Вступ. Лікування безпліддя у жінок з ендометріозом є важливою і невирішеною проблемою як в Україні, так і у світі. Водночас у пацієнок із безпліддям простежується і низька ефективність використання допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Оптимальним підходом у програмі підготовки до ДРТ жінок з ендометріозом, на думку авторів цього дослідження, є саме використання пробіотиків із вмістом лактобактерій, як потенційних факторів зниження продукування провокуючих медіаторів ендометріозу та збільшення шансів успішної вагітності.

Мета: обґрунтувати доцільність інкорпорації пробіотиків до програми підготовки додоміжних репродуктивних технологій у жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям.

Методи та матеріали. До дослідження залучили 88 жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям (основна група) та 68 жінок із безпліддям трубного генезу (контрольна група). Для аналізу експресії гену NLRP3-інфламасоми, HMGB1, IL1 β і визначення відносної нормалізованої експресії мРНК NLRP3, HMGB1, IL1 β використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Визначення рівня мезотеліну в сироватці крові поводити методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA).

Результати. Оцінюючи досліджувані показники залежно від типу безпліддя (первинне чи вторинне), теж отримали результати, які свідчать, що у жінок із ендометріозом та первинним безпліддям простежувалися вірогідно вищі показники мезотеліну, активності інфламасоми NLRP3, IL-1 β та HMGB1. Зокрема, рівень мезотеліну у жінок основної групи з первинним безпліддям був вірогідно вищим порівняно з жінками з вторинним безпліддям як в сироватці крові, так і в перитональній рідині, відповідно: (0.86 \pm 0.001 нг/мл та 0.69 \pm 0.001 нг/мл) ($p < 0.01$) до (0.67 \pm 0.001 нг/мл та 0.42 \pm 0.001 нг/мл) ($p < 0.001$).

Висновки.

1. Дослідження підтвердило, що рівні експресії мРНК NLRP3, IL-1 β , HMGB1 та мезотеліну корелюють з тяжкістю ендометріозу і можуть бути потенційними маркерами прогресування захворювання. Ці молекули надалі є перспективними цілями для терапевтичних стратегій у лікуванні ендометріозу, асоційованого з безпліддям.

Pathogenetic justification of the use of probiotics in preparation programs for assisted reproductive technologies in women with endometriosis based on studying indicators of the level of mesothelin, mRNA IL1 β , HMGB1, NLRP3-INFLAMMASOME

Oksana Bakun¹, Halyna Koval¹, Natalya Muzyka¹,
Lawrence DuBuske^{2,3}, Ksenia Slobodian¹

¹ Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

² George Washington University Hospital (Washington, USA)

³ Immunology Research Institute of New England (Gardner, Massachusetts, USA)

Introduction: At the same time, the low efficiency of the use of assisted reproductive technologies (ART). The optimal approach in the program of preparation for ART of women with endometriosis is precisely probiotics with the content of lactobacilli as potential factors for reducing the production of provoking mediators of endometriosis and increasing the chances of a successful pregnancy.

Aim: To justify the feasibility of including probiotics in the program of preparation for intrauterine reproductive technologies in women with endometriosis-associated infertility.

Methods and materials: The study included 88 women with endometriosis associated with infertility (the main group) and 68 women with tubal infertility (the control group). To analyze the expression of the NLRP3-inflammasome gene, HMGB1, IL1 β and determine the relative normalized expression of NLRP3, HMGB1, IL1 β mRNA, we used the polymerase chain reaction with reverse transcription in real-time (RT-PCR). The mesothelin level in blood serum was determined using the solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Evaluating the studied indicators depending on the type of infertility (primary or secondary), results were also obtained, which indicate that women with endometriosis and primary infertility had significantly higher levels of mesothelin, NLRP3, IL-1 β , and HMGB1 inflammasome activity. In particular, the level of mesothelin in women of the main group with primary infertility was significantly higher compared to women with secondary infertility both in blood serum and peritoneal fluid, respectively (0,86 \pm 0,001 ng/ml and 0,69 \pm 0,001 ng/ml) ($p < 0,01$) to (0,67 \pm 0,001 ng/ml and 0,42 \pm 0,001 ng/ml) ($p < 0,001$).

Conclusions

1. The study confirmed that the mRNA expression levels of NLRP3, IL-1 β , HMGB1 and mesothelin correlate with the severity of endometriosis and can be potential markers of disease progression. These molecules are promising targets for further therapeutic strategies in the treatment of infertility-associated endometriosis.
2. The study showed that the level of mesothelin in blood serum is 1,25 times higher in women with primary infertility than with secondary infertility and correlates with the severity of the disease, which indicates its possibility to be an independent marker for the diagnosis of endometriosis.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.14

For correspondence: Bukovinian State Medical University (2 Teatralna Square, Chernivtsi, Ukraine, 58000)

E-mail: kupchanko06@gmail.com

Received: 7 Dec, 2024

Accepted: 20 Dec, 2024

Published: 27 Dec, 2024

ORCID IDs

Oksana Bakun:

<https://orcid.org/0000-0002-4742-2265>

Halyna Koval:

<https://orcid.org/0000-0002-4742-2265>

Natalya Muzyka:

<https://orcid.org/0000-0002-3381-1163>

Lawrence DuBuske:

<https://orcid.org/0000-0001-5013-8022>

Ksenia Slobodian:

<https://orcid.org/0000-0001-7872-6731>

Authors Contributions:

Conceptualizations: Oksana Bakun;

Results of study: Oksana Bakun;

Writing: Oksana Bakun, Halyna Koval;

Review & editing: Oksana Bakun, Halyna Koval, Natalya Muzyka, Ksenia Slobodian

Disclosures: The authors declared no conflict of interest

Ethical approval: The Bioethics Committee of the Bukovinian State Medical University (Approval protocol No. 8 dated May 16, 2024)

Funding: The authors did not receive any financial support for their research



© All authors, 2024

2. Дослідження засвідчило, що рівень мезотеліну в сироватці крові в 1.25 разів вищий у жінок із первинним безпліддям, порівняно із вторинним, і корелює з тяжкістю захворювання, що свідчить про його можливість бути самостійним маркером діагностики ендометріозу.
3. Використання пробіотиків у програмах підготовки до допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) у жінок з ендометріозом є доцільним, про що свідчать також літературні джерела.

Ключові слова: безпліддя, ендометріоз, ендометрій, інфламасома, цитокіни, лактобактерії, пробіотики, допоміжні репродуктивні технології.

Вступ

Лікування безпліддя у жінок з ендометріозом є важливою і невирішеною проблемою як в Україні, так і у світі. У цієї когорти пацієнток простежується низька ефективність всіх відомих методів лікування безпліддя, зокрема, і з використанням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [1–5]. Беручи до уваги дані численних наукових досліджень, одними з провідних патогенетичних чинників розвитку ендометріозу є гіперактивація імунних клітин з підвищеним продукуванням ростових факторів та прозапальних цитокінів [5–9]. Логічно можна припустити, що потенційними патогенетично обґрунтованими засобами лікування ендометріозу можуть бути препарати, здатні системно чи локально пригнічувати гіперактивацію імунних факторів. Проте класичні підходи імуносупресії, які використовують для корекції інших нерепродуктивних гіперімунних вад, неприйнятні для лікування безпліддя через низьку побічних ефектів та ймовірного негативного впливу на дитину.

Упродовж останніх років накопичилося багато даних, які засвідчують важливу імунomodуючу роль мікробіоти, з одного боку, та впливу зміни мікробіому піхви та ендометрію на результати лікування безпліддя як загалом, так і за ендометріозу – з іншого. Тому наукова спільнота з особливою увагою розглядає взаємозв'язки між імунопосередкованими реакціями та мікробіомом, можливості модуляції мікробіому як чинника, здатного зменшити гіперімунні реакції та поліпшити репродуктивні показники [10–13].

Як відомо, жіночий статевий тракт містить визначений мікробний спектр, а ендометрій, зокрема, має унікальний мікробіом, незважаючи на те, що впродовж багатьох десятиліть його вважали стерильним [10;

11]. Відповідно до багатьох досліджень, найпоширенішим представником мікробіому ендометрію є рід *Lactobacillus* [11–15]. Є дослідження, що лактобактерії модулюють імунний гомеостаз різними способами, включно з пригніченням сигналів ядерного фактора κВ (NF-κВ) та синтезом низки прозапальних цитокінів, значно послаблюючи запалення. Відомі також переконливі дані, що молочна кислота, яка продукується лактобактеріями, може сприяти сприйнятливості ендометрію та інвазії бластоцисти, а це означає, що кількість лактобактерій у жіночих статевих шляхах має значення для настання вагітності. Синхронізуються з цими даними дослідження про те, що найуспішнішим для перенесення ембріона є вагінальний мікробіом з домінуючими *Lactobacillus* [1–14].

Тим часом численні дослідження демонструють, що інші бактерії та бактеріальні фрагменти можуть спричиняти запальні імунні відповіді (опосередковані прозапальними цитокінами) у преімплантаційному періоді, погіршуючи результати репродукції [8; 9; 13; 16; 17; 18]. Остання теза – опосередкованість прозапальними цитокінами повністю збігається з патогенезом ендометріозу – отже, потреба модуляції мікробіому з метою модуляції прозапального імунного профілю у жінок із ендометріозом та безпліддям продиктована обома станами.

Тому розуміння шляхів модуляції мікробіому може бути одним із ключів для розв'язання проблеми поліпшення успішності лікування безпліддя у жінок, зокрема, які страждають на ендометріоз.

Враховуючи наведені докази, на наш погляд, оптимальним підходом у програмі підготовки до ДРТ жінок з ендометріозом є саме пробіотики з умістом лактобактерій як

3. The literature data indicates that the use of probiotics in programs of preparation for assisted reproductive technologies (ART) in women with endometriosis is appropriate.

Key words: infertility, endometriosis, endometrium, inflammasome, cytokines, lactobacilli, probiotics, assisted reproductive technologies.

Introduction

The treatment of infertility in women with endometriosis is an important and unsolved problem both in Ukraine and in the world. In this cohort of patients, the efficiency of all known infertility treatment methods, including the use of assisted reproductive technologies (ART), remains low [1–5]. Considering the data from numerous scientific studies, one of the leading pathogenetic factors in the development of endometriosis is the hyperactivation of immune cells with increased production of growth factors and pro-inflammatory cytokines [5–9]. Logically, it can be assumed that drugs capable of systemically or locally inhibiting the hyperactivation of immune factors can act as potential pathogenetically justified means of treating endometriosis. However, classical approaches of immunosuppression, which are used to correct other non-reproductive hyperimmune disorders, are unacceptable in the case of infertility treatment due to some side effects and possible negative impact on the child.

In recent years, a lot of data have been accumulated that indicate the important immunomodulatory role of the microbiota, on the one hand, and the influence of changes in the microbiome of the vagina and endometrium on the results of infertility treatment, both in general and for endometriosis, on the other hand. Therefore, the scientific community paid special attention to the relationship between immune-mediated reactions and the microbiome and the possibilities of modulating the microbiome as a factor capable of reducing hyperimmune reactions and improving reproductive performance [10–13].

As is known, the female genital tract contains a defined microbial spectrum, and the endometrium, in particular, has a unique microbiome, although, for many decades, it was considered sterile [10; 11]. According to many studies, the predominant representative of the microbiome of the endometrium is the ge-

nus *Lactobacillus* [11–15]. Studies show that lactobacilli modulate immune homeostasis in various ways, including inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and the synthesis of several pro-inflammatory cytokines, thereby significantly reducing inflammation. Also, there is convincing evidence that lactic acid produced by lactobacilli can promote endometrial receptivity and blastocyst invasion, which means that the number of lactobacilli in the female genital tract is essential for pregnancy. Synchronized with these data are studies that the most successful for embryo transfer is the vaginal microbiome, with dominant *Lactobacillus* [12–14].

On the other hand, numerous studies demonstrate that other bacteria and bacterial fragments can cause inflammatory immune responses (mediated by pro-inflammatory cytokines) in the peri-implantation period, worsening reproductive outcomes [8; 9; 13; 16; 17; 18]. The final thesis is that pro-inflammatory cytokine-mediated endometriosis pathogenesis is fully congruent. Thus, the need to modulate the microbiome to modulate the pro-inflammatory immune profile in women with endometriosis and infertility is dictated by both conditions.

Therefore, understanding the ways of modulating the microbiome may be one of the keys to solving the problem of improving the success of infertility treatment in women, including those suffering from endometriosis.

Taking into account the above, in our opinion, the optimal approach in the program of preparation for ART for women with endometriosis is precisely probiotics containing lactobacilli as potential factors for reducing the production of provoking mediators of endometriosis and increasing the chances of successful pregnancy.

The purpose of the study: To justify the feasibility of including probiotics in the program

потенційні фактори зниження продукування прововуючих медіаторів ендометріозу та збільшення шансів успішної вагітності.

Мета дослідження: обґрунтувати доцільність занесення пробіотиків до програми підготовки до додоміжних репродуктивних технологій жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в Буковинському державному медичному університеті та, відповідно до угоди про співпрацю, на клінічній базі КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя» (Чернівці, Україна). Усі досліджувані пацієнтки перебували на амбулаторному та стаціонарному обстеженні та лікуванні в КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя» в період із 2017 по 2023 роки.

Забезпечення вимог біоетики

Дослідження проводили з урахуванням основних положень GCP ICH та Гельсінської декларації щодо біомедичних досліджень, та наступних її переглядів (Сеул, 2008), протоколу Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 4 квітня 1997 року), рекомендацій Комітету з біоетики при Президії АМН України (2002), згідно з позитивним висновком комісії з біоетики Буковинського державного медичного університету та локальної комісії з біомедичної етики при КЗОЗ «Медичний центр лікування безпліддя» (протокол схвалення № 8 від 16 травня 2024 року).

Це передбачало дотримання концепції інформованої згоди пацієнта на проведення досліджень, урахування переваг користі над ризиком шкоди, принципу конфіденційності та поваги до особистості пацієнта та інших етичних принципів стосовно осіб, які є об'єктом дослідження.

Основну групу дослідження склали 88 жінок з верифікованим ендометріозом, асоційованим із безпліддям (віком від 21 до 44 років, середній вік – 29.65 років). Первинне безпліддя виявили у 74 жінок (84 %), вторинне безпліддя – у 14 пацієнок (16 %). Отже, кількість пацієнок, у яких виявили первинне безпліддя, значно переважала над пацієнтками із вторинним безпліддям ($p < 0.001$).

Усім жінкам виконали діагностичну лапароскопію. Стадії ендометріозу класифікували відповідно до засад класифікації ендометріальних захворювань Американської Спілки репродуктивної медицини, 1997 (American Fertility Society Revised Classification of Endometriosis, r-AFS-97). Пацієнок основної групи розподілили відповідно до такої класифікації: стадія 1 (1 – 5 балів) виявлена у 48 % пацієнок; стадія 2 (6 – 15 балів) – у 23 %; стадія 3 (16 – 40 балів) – у 25 % і стадія 4 (40 балів і більше) – у 4 % пацієнок.

Пацієнтки основної групи були розподілені на дві підгрупи: підгрупа-1 (48 жінок, яким виконали традиційну підготовку до ДРТ (відповідно до наказів МОЗ України № 787 від 09.09.2013 «Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні» та № 1030/102 від 29.11.2013 «Про удосконалення системи планування сім'ї та охорони репродуктивного здоров'я в Україні») та підгрупа - 2 (40 жінок, яким виконали запропоновану нами підготовку до ДРТ із вмістом пробіотика).

Пацієнткам підгрупи-2 призначали таблетований пробіотик виробництва Unic Biotech Ltd (Індія) по 1 таблетці двічі на день, кожна з яких містила 10×10^9 Lactobacillus.

До контрольної групи зарахували 68 здорових жінок з трубним фактором в анамнезі. Оперативні втручання (гістеро- та лапароскопію) у пацієнок контрольної групи виконували у зв'язку зі скаргами на безпліддя та за відсутності жодної патології у обох партнерів.

Для зарахування до основної групи керувались такими критеріями:

- безпліддя тривалістю не менше двох років;
- інформована згода;
- наявність верифікованого ендометріозу;
- прохідність маткових труб.

Для зарахування до контрольної групи керувались такими критеріями:

- трубне безпліддя;
- відсутність ознак гострого гідросальпінксу;
- добровільна інформована згода на обстеження.

Критерії вилучення: загострення супутніх захворювань, наявність інфекційного про-

of preparation for intrauterine reproductive technologies in women with endometriosis associated with infertility.

Materials and Methods

The study was conducted at the Bukovynian State Medical University and, following the cooperation agreement, at the clinical base of the Medical Center for the Treatment of Infertility (Chernivtsi, Ukraine). All studied patients underwent outpatient and inpatient examination and treatment at the Medical Center "Medical Center for Infertility Treatment" (Chernivtsi) from 2017 to 2023.

Ensuring the requirements of bioethics

The study was conducted taking into account the main provisions of the GCP ICH and the Declaration of Helsinki on biomedical research and its subsequent revisions (Seoul, 2008) and the protocol of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine (April 4, 1997), recommendations of the Committee on Bioethics under the Presidium Academy of Medical Sciences of Ukraine (2002) according to the favorable opinion of the Bioethics Committee of the Bukovynian State Medical University and the local Biomedical Ethics Committee at the Medical Center for the Treatment of Infertility.

This required compliance with the concept of the patient's informed consent for conducting research, taking into account the advantages of benefit over the risk of harm, the principle of confidentiality and respect for the patient's personality, and other ethical principles regarding persons who are the object of research.

The main group of the study consisted of 88 women with verified endometriosis associated with infertility (aged 21 to 44, average age – 29.65). Primary infertility was noted in 74 women (84%), and secondary infertility in 14 patients (16%). Therefore, the number of patients with primary infertility significantly outnumbered patients with secondary infertility ($p < 0,001$). All women underwent diagnostic laparoscopy. The stages of endometriosis were classified according to the classification of endometriosis of the American Society of Reproductive Medicine, 1997 (American Fertility Society Revised Classification of Endometriosis, r-AFS-97). Patients of the main group

were divided according to classification: stage 1 (1–5 points) was found in 48% of patients; stage 2 (6–15 points) – in 23%; stage 3 (16–40 points) – in 25% and stage 4 (40 points and more) – in 4% of patients.

Patients of the main group were divided into two subgroups: subgroup 1 (48 women who underwent traditional preparation for ART, Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 787 dated September 9, 2013, "On Approving the Procedure for Using Assisted Reproductive Technologies in Ukraine" and No. 1030/102 dated November 29, 2013, "On Improvement Systems of Family Planning and Reproductive Healthcare in Ukraine") and subgroup 2 (40 women who underwent our suggested preparation for ART using probiotics).

The patients of the two subgroups were prescribed a tablet probiotic produced by Unic Biotech Ltd, India, one tablet twice a day, each containing 10×10^9 Lactobacillus.

The control group included 68 healthy women with a history of tubal factor. Operative interventions (hysteroscopy and laparoscopy) in patients of the control group were performed in connection with complaints of infertility and the absence of any pathology in both partners.

For inclusion in the main group, the following criteria were used:

- infertility lasting at least 2 years;
- informed consent;
- presence of verified endometriosis;
- patency of fallopian tubes.

The following criteria were used for inclusion in the control group:

- tubal infertility;
- lack of signs of acute hydrosalpinx;
- voluntary informed consent for examination.

Exclusion criteria: aggravation of concomitant diseases, an infectious process, taking hormonal contraceptives, being dangerous, and a positive test for COVID-19.

Research materials

Endometrial tissue material, endometrioid heterotopias, peripheral blood and peritoneal fluid, were collected for the study from the women of the studied groups. To control the

цесу, приймання гормональних контрацептивів, опасистість, позитивний тест на Covid-19.

Матеріали дослідження

Для дослідження у жінок досліджуваних груп набирали матеріал тканини ендометрію, ендометріюїдні гетеротопії, периферичну кров та перитонеальну рідину. Задля контролю ефективності ДРТ із вмістом пробіотика кров відбирали за місяць після виконаної підготовки (лікування).

Методи дослідження

Молекулярно-генетичні дослідження

Для аналізу експресії гену NLPP3-інфламасоми HMGB1, IL1 β і визначення відносної нормалізованої експресії мРНК NLPP3, HMGB1, IL1 β використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР).

Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом ЗТ-ПЛР була фракція монукулеарних клітин, виділених з цільної крові хворих на ендометріоз.

Імуноферментний аналіз

Визначення рівня мезотеліну в крові та перитонеальній рідині виконували методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням наборів фірми Fine Test виробництва Китаю на приладі Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, використовуючи інструкцію для проведення дослідження. Набір базувався на технології сандвіч-зв'язаного імуноферментного аналізу.

Статистична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз виконували з використанням програмного забезпечення Medcalc, Statistica, Excel.

Категоріальні дані описували абсолютними та відносними частотами. Групи порівнювали за критерієм χ^2 -квадрат та критерієм Фішера.

Кількісні змінні описували з використанням середнього (M) і стандартного (SD) відхилення для нормально розподілених вибірок та з використанням медіани (Me) та інтерквартильного розмаху (IQR), якщо розподіл відрізнявся від нормального. Розподіл випадкової величини на нормальність перевіряли, використовуючи критерій Шапіро-Вілка.

Для порівняння неперервних змінних, що мали нормальний розподіл, використовували парний та непарний t-критерій Стьюдента; для змінних, розподіл яких відрізнявся від нормального, використовували U-критерій Манна-Уїтні та двосторонній ранговий критерій Вілкоксона. Результати вважали статистично значущими при $p < 0.05$.

Результати

На попередніх етапах роботи у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям, дослідили рівні таких прозапальних маркерів, як маркер пошкодження очеревини мезотелін та експресію NLRP3, IL-1 β та HMGB1 у сироватці крові та локально в перитонеальній рідині та отримали результати, що свідчать про вірогідне підвищення усіх перелічених показників. Дані наведені в таблиці 1.

Виконали дослідження показників рівня мезотеліну, експресії генів мРНК NLRP3, IL-1 β , HMGB1 у сироватці крові жінок до та після підготування їх до допоміжних репродуктивних технологій, що наведені в таблиці 2.

Враховуючи ймовірне патогенетичне значення досліджуваних прозапальних чинників у розвитку ендометріозу, дослідили

Таблиця 1

Рівень мезотеліну, експресія NLRP3, IL-1 β , HMGB1 у сироватці крові досліджуваних жінок (M \pm m)

Показник	Основна група (жінки з ендометріозом, асоційованим із безпліддям) (n = 88)	Контрольна група (n = 68)	P
Концентрація мезотеліну (нг/мл)	0.73 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01	<0.05
Експресія мРНК NLRP3-інфламасоми (y.o.)	44.43 \pm 3.72	0.85 \pm 0.03	<0.001
Експресія мРНК IL-1 β (y.o.)	26.47 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	<0.001
Експресія мРНК HMGB1 (y.o.)	11.91 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	<0.001

effectiveness of ART with the inclusion of probiotics, blood was collected one month after the preparation (treatment).

Research methods

Molecular genetic studies

To analyze the expression of the gene NLPP3-inflammasome HMGB1, IL1 β and determine the relative normalized expression of mRNA NLPP3, HMGB1, IL1 β , the polymerase chain reaction with reverse transcription in real-time (RT-PCR) was used.

The object of molecular genetic studies using the RT-PCR method was the fraction of mononuclear cells isolated from the whole blood of patients with endometriosis.

Enzyme immunoassay

The mesothelin level in blood and peritoneal fluid were determined by the method of solid-phase enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) using Fine Test kits manufactured in China and "Wuhan Fine Biotech Co., Ltd" device, based on the instructions for conducting the study. The kit was based on the technology of sandwich immunoenzymatic analysis.

Statistical processing of the obtained results

Statistical analysis was performed using Medcalc, Statistica, and Excel software.

Absolute and relative frequencies described categorical data. Groups were compared using the Chi-square test and Fisher's test.

Quantitative variables were described by mean (M) and standard deviation (SD) for normally distributed samples and by median (Me) and interquartile range (IQR) when the distribution was non-normal. Checking the distribu-

tion of a random variable for normality was carried out using the Shapiro-Wilk test.

A paired and unpaired Student's t-test was used to compare continuous variables with a normal distribution. The Mann-Whitney U-test and two-sided Wilcoxon rank test were used for variables whose distribution differed from normal. The results were considered statistically significant at $p < 0,05$.

Results

In earlier stages of the work, the levels of pro-inflammatory markers such as the peritoneal damage marker mesothelin and the expression of NLRP3, IL-1 β and HMGB1 in serum and locally in the peritoneal fluid were investigated in women with endometriosis associated with infertility, and results were obtained indicating a probable increase all the indicators listed above. The data are shown in Table 1.

A study of mesothelin level indicators, NLRP3, IL-1 β , and HMGB1 mRNA gene expression in the blood serum of women before and after preparation for assisted reproductive technologies was carried out, which is shown in Table 2.

Considering the probable pathogenetic significance of the studied pro-inflammatory factors in developing endometriosis, their dynamic changes were investigated depending on the severity of endometriotic lesions. When evaluating the level of mesothelin, the expression of NLRP3, IL-1 β , and HMGB1 depending on the stage of endometriosis, the results of an increase in these indicators were also obtained in women with moderate and severe endometriosis compared to the mild course of the disease, which indicates the role of these factors in the progression of the disease as markers and possible pathogenetic factors (Figure 1).

Table 1.

Level of mesothelin, expression of NLRP3, IL-1 β , HMGB1 in blood serum of the studied women (M \pm m)

Indicator	Main group (women with endometriosis associated with infertility) (n = 88)	Control group (n = 68)	p
Mesothelin concentration (ng/ml)	0,73 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	<0,05
NLRP3-inflammasome mRNA expression (c.u.)	44,43 \pm 3,72	0,85 \pm 0,03	<0,001
IL-1 β mRNA expression (c.u.)	26,47 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	<0,001
Expression of HMGB1 mRNA (c.u.)	11,91 \pm 0,01	1,00 \pm 0,01	<0,001

Таблиця 2

Рівень мезотеліну, експресія NLRP3, IL-1 β , HMGB1 у сироватці крові жінок до- та після підготовки до допоміжних репродуктивних технологій (M \pm m)

Показник	Основна група (жінки з ендометріозом, асоційованим із безпліддям) (n = 88)		P
	до підготовки до ДРТ	після підготовки до ДРТ	
Концентрація мезотеліну (нг/мл)	0.73 \pm 0.01	0.59 \pm 0.01	<0.05
Експресія мРНК NLRP3-інфламасоми (у.о.)	44.43 \pm 3.72	0.70 \pm 0.01	<0.001
Експресія мРНК IL- 1 β (у.о.)	26.47 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	<0.001
Експресія мРНК HMGB1 (у.о.)	11.91 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	<0.001

їхні динамічні зміни залежно від вираженості ендометріозних уражень. При оцінці рівня мезотеліну, експресії NLRP3, IL-1 β , HMGB1 залежно від стадії ендометріозу теж отримали результати зростання цих показників у жінок із середнім та тяжким ендометріозом порівняно з легким перебігом хвороби, що свідчить про роль цих факторів у прогресуванні захворювання як маркерів та можливих патогенетичних чинників (рис. 1).

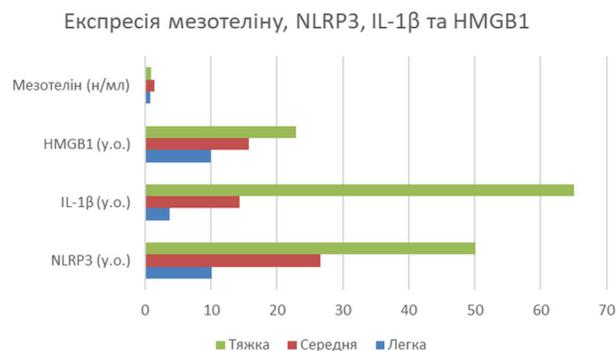


Рисунок 1. Рівень мезотеліну та експресії генів мРНК NLRP3, IL1 β , HMGB1 залежно від стадій ендометріозу

Логічним було дослідити, чи впливають зміни рівня мезотеліну, експресії мРНК генів NLRP3, IL-1 β , HMGB1 на безпліддя у жінок з ендометріозом. З цією метою виконали оцінку зазначених показників залежно від виду безпліддя (первинне чи вторинне). Отримані результати свідчать, що у жінок з ендометріозом та первинним безпліддям виявили вірогідно вищі показники мезотеліну, активності інфламасоми NLRP3, IL- 1 β та HMGB1 порівняно з жінками із вторинним безпліддям. Зокрема, рівень мезотеліну у жінок основної групи з первинним безпліддям був вірогідно вищим порівняно з жінками із вторинним безпліддям як в сироватці кро-

ві, так і в перитонеальній рідині, відповідно (0.86 \pm 0.001 нг/мл та 0.69 \pm 0.001 нг/мл) (p < 0.01) до (0.67 \pm 0.001 нг/мл та 0.42 \pm 0.001 нг/мл) (p < 0.001).

Обговорення

Як відомо, мезотелін є антигеном клітинної поверхні, який вибірково експресується саме в мезотеліальних клітинах, що вкривають серозні порожнини, включно з очеревиною [19–20]. А ендометріоз – це захворювання, яке вражає передусім очеревину. Зважаючи на те, що анатомія мезотелію обмежена очеревиною, перикардом та плеврою, а досліджувані жінки пройшли комплексне обстеження з відхиленням ураження плевральної та перикардальної порожнин та інших причин ураження очеревини, окрім ендометріозу, то мезотелін можна розглядати як специфічний маркер ураження очеревини саме ендометріозом. Наші дослідження виявили вірогідно підвищений рівень мезотеліну у жінок з ендометріозом із тенденцією до зростання при його прогресуванні та вищими показниками при первинному безплідді у жінок з ендометріозом порівняно із вторинним. Це нашою думку, що мезотелін може бути як самостійним маркером прогресування ендометріозу та його ускладнень (безпліддя) внаслідок безпосереднього вивільнення з мезотеліальних клітин під час їхнього ураження ендометріозною ектопією, так і чинником, що підтримує запалення. Якщо проаналізувати останню тезу, то варто вказати на той факт, що клітини мезотелію є важливими регуляторами імунних реакцій і відіграють вирішальну роль у тканинному гомеостазі серозних порожнин, зокрема очеревини [20–21]. Як відомо, ця властивість мезотеліальних клітин давно використовується в таргетній терапії низки солідних пухлин [22].

Table 2.

Level of mesothelin, expression of NLRP3, IL-1 β , HMGB1 in blood serum of women before and after preparation for assisted reproductive technologies (M \pm m)

Indicator	Main group (women with endometriosis associated with infertility) (n = 88)		p
	to prepare for ART	after preparing for ART	
Mesothelin concentration (ng/ml)	0,73 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	<0,05
NLRP3-inflammasome mRNA expression (c.u.)	44,43 \pm 3,72	0,70 \pm 0,01	<0,001
IL-1 β mRNA expression (c.u.)	26,47 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	<0,001
Expression of HMGB1 mRNA (c.u.)	11,91 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	<0,001

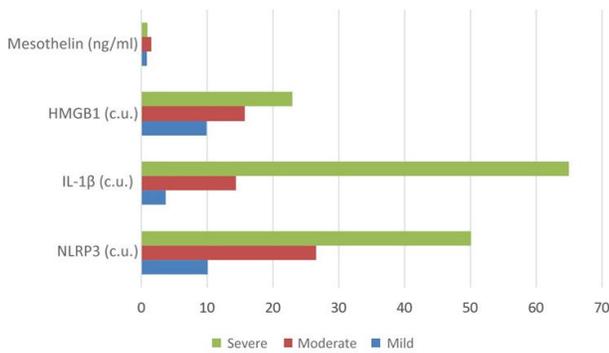


Figure 1. The level of mesothelin and gene expression of mRNA NLRP3, IL1 β , HMGB1 depending on the stages of endometriosis

It was logical to investigate whether changes in the level of mesothelin, mRNA expression of genes NLRP3, IL-1 β , and HMGB1 affect infertility in women with endometriosis. For this aim, these indicators were assessed depending on the type of infertility (primary or secondary). The obtained results indicate that women with endometriosis and primary infertility had significantly higher levels of mesothelin, NLRP3 inflammasome activity, IL-1 β and HMGB1 compared to women with secondary infertility. In particular, the level of mesothelin in women of the main group with primary infertility was significantly higher compared to women with secondary infertility both in blood serum and peritoneal fluid, respectively (0,86 \pm 0,001 ng/ml and 0,69 \pm 0,001 ng/ml) ($p < 0,01$) to (0,67 \pm 0,001 ng/ml and 0,42 \pm 0,001 ng/ml) ($p < 0,001$).

Discussion

As is known, mesothelin is a cell surface antigen selectively expressed in mesothelial cells covering serous cavities, including the peritoneum [19–20]. Endometriosis is a dis-

ease that primarily affects the peritoneum. Given that the anatomy of the mesothelium is limited to the peritoneum, pericardium and pleura, and the studied women underwent a comprehensive examination excluding the impression of the pleural and pericardial cavities and other causes of the peritoneum impression, except endometriosis, mesothelin can be considered as a specific marker of damage to the peritoneum caused by endometriosis. Our studies revealed a likely elevated level of mesothelin in women with endometriosis with a tendency to increase with its progression and higher rates of primary infertility in women with endometriosis compared to secondary. This suggests that mesothelin can be both an independent marker of the progression of endometriosis and its complications (infertility) as a result of direct release from mesothelial cells during their damage by endometriotic ectopy and a factor that supports inflammation. If we analyze the last thesis, we should point out that mesothelium cells are important regulators of immune reactions and play a decisive role in the tissue homeostasis of serous cavities, particularly the peritoneum [20–21]. As is known, this property of mesothelial cells has long been used in targeted therapy of some solid tumors [22].

Since endometriosis involves the disruption of tissue homeostasis, which occurs with the participation of immune mechanisms, we investigated the main factors leading to the initiation of the pro-inflammatory cascade.

The NLRP3 inflammasome plays a special role in this cascade, a complex that includes Nod-like receptor (NLR) family proteins that perceive molecular patterns associated with pathogens and molecular processes that al-

Оскільки при ендометріозі порушення тканинного гомеостазу відбувається за участі імунних механізмів, ми дослідили провідні чинники запуску прозапального каскаду.

Особливу вагу в цьому каскаді має інфламасома NLRP3 – комплекс, що містить білки сімейства Nod-подібних рецепторів (NLR), які сприймають молекулярні патерни, пов'язані з патогенами, і молекулярні процеси, що змінюють гомеостаз. Після розпізнання паттерну відбувається активація TLRs та NLRs, з наступною активацією інфламасоми NLRP3, активації MyD88-залежного сигнального шляху із активацією транскрипції NF- κ B і синтезу великої кількості прозапальних цитокінів та ростових факторів, зокрема досліджуваного у цій роботі IL-1 β та інших відомих чинників ендометріозу, таких як HGF, VEGF, IL-6 і TNF- α в очеревині [23; 24]. У нашому дослідженні отримано вірогідне підвищення як експресії інфламасоми NLRP3, так і рівня індукованого каскадом її активації IL-1 β , що збігається з іншими відомими дослідженнями. Водночас варто зауважити, що за аналогією з рівнем мезотеліну, експресія NLRP3 у жінок з ендометріозом зростала не лише порівняно з групою контролю, а й при прогресуванні ендометріозу.

У контексті значення інфламасоми NLRP3 та активованого нею прозапального каскаду в лікуванні ендометріозу, нещодавні дослідження засвідчили ефективність інгібіторів NLRP3 – у мишачій моделі лікування інгібітором інфламасоми виявили зменшення розмірів ендометріюїдних уражень порівняно з контролем (89 ± 15 проти 49 ± 9.3 мм³ на яєчник; $p < 0.05$); також відбулося зниження експресії IL-1 β в епітелії ендометріозних вогнищ [24]. Тоді як своєрідними природними регуляторами активності NLRP3 є структури, що філогенетично оселяються в репродуктивних шляхах – тобто представники нормальної мікробіоти [25]. На додаток, представники нормальної мікробіоти зменшують активацію PRRs та активований ними каскад MyD88-залежного сигнального шляху з активацією транскрипції NF- κ B. Зокрема, є роботи, які свідчать, що блокування PRRs нормальною мікробіотою, як-от лактобактеріями, сприяє зниженню прозапальних медіаторів та активації кілерних клітин в залученій зоні. Отже, відомі дослідження вка-

зують на зв'язок ендометріозу та безпліддя із прозапальною відповіддю через активацію вісі PRRs-MyD88-NF- κ B та на можливість впливу на неї використанням як терапевтичного агента нормальних мікроорганізмів, а саме – лактобактерій [25–28].

Одночасно зростає зацікавленість до дослідження додаткових факторів, здатних вплинути на показники успішності ДРТ. У цьому контексті має достатні перспективи потенційний вплив мікробіоти. Цікаво, що модулюючою здатністю, ймовірно, володіє саме мікробіота (лактобактерії), оскільки дослідження свідчать про зв'язок невдач ДРТ як між змінами мікробіому ендометрія, так і вагінальної мікробіоти, причому переважно через лактобактерії [27–30]. Зокрема, Куono et al. виявили знижену чисельність *лактобактерій* у порівнянні між жінками, які завагітніли з ДРТ і без, засвідчуючи, що велика кількість пацієнок з потребою ДРТ мають дисбіотичний мікробіом на рівні ендометрія і що високий вміст лактобактерій може поліпшити результати імплантації [30–32].

Водночас важливе значення для успішної імплантації та успіху вагітності має взаємозв'язок між бластоцистою та рецептивною маткою, зокрема, передавання сигналів прогестерону (P4) через ядерний рецептор прогестерону (PR). Скажімо, дослідження групи Sudhansu K. Dey, 2020, виявили роль у цьому процесі нового фактора, а саме – ядерного білка високорухливої групи 1 (high-mobility group box-1, HMGB1). У своєму дослідженні вони надали докази того, що ядерний HMGB1 сприяє успішній імплантації бластоцисти, підтримуючи передавання сигналів P4 і обмежуючи накопичення макрофагів для ослаблення шкідливих запальних реакцій. Це дослідження надихнуло нас проаналізувати значення HMGB1 у цій роботі і, отримавши результати підвищеної експресії HMGB1 у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям, з тенденцією до зростання при прогресуванні захворювання та при первинному безплідді, ми підтвердили свою гіпотезу. Є докази того, що HMGB1 функціонує як молекула, пов'язана з пошкодженням, у клітинах *in vitro* в умовах стресу або у мишей, які зазнали впливу ЛПС [33–34]. Після секреції HMGB1 подає запальні сигнали, активуючи, зокрема, толл-подібний рецептор 2 (TLR2)

ter homeostasis. After pattern recognition, activation of TLRs and NLRs occurs, followed by activation of the NLRP3 inflammasome, activation of the MyD88-dependent signaling pathway with activation of NF- κ B transcription, and the synthesis of a large number of pro-inflammatory cytokines and growth factors, in particular IL-1 β , which was studied in this work, and other known factors of endometriosis as HGF, VEGF, IL-6 and TNF- α in the peritoneum [23; 24]. In our study, we obtained a probable increase in both the expression of the NLRP3 inflammasome and the level of the IL-1 β -induced cascade of its activation, which coincides with known studies. Along with that, it is worth noting that by analogy with the mesothelin level, the expression of NLRP3 in women with endometriosis increased not only compared to the control group but also with the progression of endometriosis.

In the context of the importance of the NLRP3 inflammasome and the pro-inflammatory cascade activated by it in the treatment of endometriosis, recent studies have shown the effectiveness of NLRP3 inhibitors – in a mouse model, treatment with an inflammasome inhibitor reduced the size of endometrioid lesions compared to the control (89 ± 15 c.u. $49 \pm 9,3$ mm³ per ovary; $p < 0,05$), a decrease in the expression of IL-1 β in the endometrial epithelium was also obtained foci [24]. At the same time, peculiar natural regulators of NLRP3 activity are structures that phylogenetically live in reproductive tracts, that is, representatives of normal microbiota [25]. In addition, representatives of the normal microbiota reduce the activation of PRRs and the MyD88-dependent signaling cascade they activate by triggering NF- κ B transcription. In particular, some works indicate that blocking PRRs by normal microbiota, particularly lactobacilli contributes to reducing pro-inflammatory mediators and activating killer cells in the involved area. Thus, known studies reveal the connection between endometriosis and infertility with a pro-inflammatory response through the activation of the PRRs-MyD88-NF- κ B axis and the possibility of influencing it by using normal microorganisms as a therapeutic agent, namely lactobacilli [25–28].

At the same time, there is growing interest in the study of additional factors that can affect the success rates of ART. In this context, the potential influence of microbiota has sufficient prospects. What is interesting, it is probably the microbiota (lactobacteria) that has the modulating ability since there are studies that indicate the connection of ART failures between changes in the endometrial microbiome and vaginal microbiota, and this is mainly due to lactobacteria [27–30]. In particular, Kyono et al. found reduced numbers of Lactobacilli among women who got pregnant with and without ART, showing that a large number of patients requiring ART have a dysbiotic microbiome at the level of the endometrium and that a high Lactobacillus content can improve implantation outcomes [30–32].

At the same time, the relationship between the blastocyst and the receptive uterus, in particular, progesterone (P4) signaling through the nuclear progesterone receptor (PR), is important for successful implantation and pregnancy success. In particular, research groups Sudhansu K. Dey, 2020, showed the role of a new factor in this process, namely the nuclear protein high-mobility group box-1 (HMGB1). Their study showed that nuclear HMGB1 promotes successful blastocyst implantation by supporting P4 signaling and limiting macrophage accumulation to attenuate deleterious inflammatory responses. This study inspired us to investigate the significance of HMGB1 in this work and, having obtained the results of increased expression of HMGB1 in women with endometriosis associated with infertility with a tendency to increase with the progression of the disease and in primary infertility, to confirm our hypothesis. There is evidence that HMGB1 functions as a damage-related molecule in cells in vitro under stress conditions or in mice exposed to LPS [33–34]. After secretion, HMGB1 provides inflammatory signals, including activation of toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4, which is in agreement with our previous studies on endometriosis [35], which also showed the role of activation, PRRs, NLRs, and TLRs and was confirmed in our work on the example of NLRP3 inflammasome activation. Studies of the influence of microbial molecules, in particular lipopolysaccharide, on the secretion of HMGB1, which contributed to

або TLR4. Це співпадає з нашими попередніми дослідженнями щодо ендометріозу [35], де також засвідчена роль активації, PRRs, NLRs, TLRs і що підтверджене у цій роботі на прикладі активації інфламасоми NLRP3. Цікавими виявилися дослідження впливу мікробних молекул, зокрема, ліпополісахариду на секрецію HMGB1, що сприяло розвитку аутоімунізації чи сепсису [36–37]. Наведені факти, а саме щодо впливу HMGB1 на процеси імплантації поряд із модуляцією PRRs під впливом мікробних паттернів, спонукали нас виявити паралелі з ендометріозом та допустити гіпотезу про ймовірну позитивну роль модуляції мікробіоти для регуляції HMGB1.

Враховуючи результати нашого дослідження, пропонуємо як можливу стратегію підвищення ефективності ДРТ у жінок з ендометріозом – спрямовану модуляцію за допомогою пробіотиків у програмах підготовки до ДРТ. Загалом узагальнення результатів нашої роботи узгоджуються з висновками багатьох інших дослідників [25; 26; 30; 31].

Висновки

1. Дослідження підтвердило, що рівні експресії мРНК NLRP3, IL-1 β , HMGB1 та мезотеліну корелюють з тяжкістю ендометріозу і можуть бути потенційними маркерами прогресування захворювання. Ці молекули є перспективними цілями для майбутніх терапевтичних стратегій у лікуванні ендометріозу, асоційованого із безпліддям.
2. Дослідження засвідчило, що рівень мезотеліну в сироватці крові у 1.25 раза вищий у жінок із первинним безпліддям, аніж із вторинним, та корелює з тяжкістю захворювання, що свідчить про його можливість бути самостійним маркером діагностики ендометріозу.
3. Використання пробіотиків у програмах підготовки до допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) у жінок з ендометріозом є доцільним, про що свідчать також дані літератури.

Список літератури

1. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches/ L.Filip et al. *Medicina*. 2020. Vol.56, no.9. P. 460. doi: <https://doi.org/10.3390/medicina56090460>
2. Endometriosis-Associated Infertility / E.-S. Nada et al. *Medicina Moderna - Modern Medicine*. 2018. Vol.25, no.3. P.131–136. doi: <https://doi.org/10.31689/rmm.2018.25.3.131>
3. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D’Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29:400–12. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/det457>
4. Management of endometriosis-related infertility: Considerations and treatment options / D. Lee et al. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2020. Vol. 47, no. 1. P.1–11. doi: <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.02971>
5. Ata B., Telek S. B. Assisted reproductive technology for women with endometriosis, a clinically oriented review. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2021. Vol. 33, no. 3. P. 225–231. doi: <https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000710>
6. Endometriosis and Assisted Reproductive Technology: A Review Article / A. Ajayi et al. *Medical & Clinical Reviews*. 2017. Vol.03, no.01. doi: <https://doi.org/10.21767/2471-299x.1000046>
7. Nanda A.K.T., Banerjee P., Dutta M., Wangdi T., Sharma P., Chaudhury K., Jana S.K. Cytokines, Angiogenesis, and Extracellular Matrix Degradation are Augmented by Oxidative Stress in Endometriosis. *Ann. Lab. Med*. 2020;40:390–397. doi: <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.5.390>
8. Hypothetical roadmap towards endometriosis: prenatal endocrine-disrupting chemical pollutant exposure, anogenital distance, gut-genital microbiota and subclinical infections / P. García-Peñarrubia et al. *Human Reproduction Update*. 2020. Vol. 26, no. 2. P. 214–246. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz044>
9. Gruber T. M., Mechsner S. Pathogenesis of Endometriosis: The Origin of Pain and Subfertility. *Cells*. 2021. Vol.10, no.6. P.1381. doi: <https://doi.org/10.3390/cells10061381>
10. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*. 2020. Vol. 30, no.6. P.492–506. doi: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
11. Gut microbiota and systemic immunity in health and disease / B. C. Lo et al. *International Immunology*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa079>

the development of autoimmunity or sepsis, turned out to be interesting [36–37]. The above, namely the effect of HMGB1 on the implantation process and the modulation of PRRs under the influence of microbial patterns, led us to see parallels with endometriosis and hypothesize a possible positive role of microbiota modulation for HMGB1 regulation.

Considering the above, directed modulation with the help of probiotics in programs of preparation for ART is proposed as a possible strategy to improve the effectiveness of ART in women with endometriosis. In general, the generalizations of the results of our work are consistent with the conclusions of other researchers [25; 26; 30; 31].

Conclusions:

1. The study confirmed that the mRNA expression levels of NLRP3, IL-1 β , HMGB1

and mesothelin correlate with the severity of endometriosis and can be potential markers of disease progression. These molecules are promising targets for further therapeutic strategies in the treatment of infertility-associated endometriosis.

2. The study showed that the level of mesothelin in blood serum is 1,25 times higher in women with primary infertility than with secondary infertility and correlates with the severity of the disease, which indicates its possibility to be an independent marker for the diagnosis of endometriosis.
3. The use of probiotics in programs of preparation for assisted reproductive technologies (ART) in women with endometriosis is appropriate, which is also indicated by the literature.

References

1. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches/ L.Filip et al. *Medicina*. 2020. Vol.56, no.9. P. 460. doi: <https://doi.org/10.3390/medicina56090460>
2. Endometriosis-Associated Infertility / E.-S. Nada et al. *Medicina Moderna - Modern Medicine*. 2018. Vol.25, no.3. P.131–136. doi: <https://doi.org/10.31689/rmm.2018.25.3.131>
3. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29:400–12. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/det457>
4. Management of endometriosis-related infertility: Considerations and treatment options / D. Lee et al. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2020. Vol. 47, no. 1. P.1–11. doi: <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.02971>
5. Ata B., Telek SB Assisted reproductive technology for women with endometriosis, a clinically oriented review. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2021. Vol. 33, no. 3. P. 225–231. doi: <https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000710>
6. Endometriosis and Assisted Reproductive Technology: A Review Article / A. Ajayi et al. *Medical & Clinical Reviews*. 2017. Vol.03, no.01. doi: <https://doi.org/10.21767/2471-299x.1000046>
7. Nanda AKT, Banerjee P., Dutta M., Wangdi T., Sharma P., Chaudhury K., Jana SK Cytokines, Angiogenesis, and Extracellular Matrix Degradation are Augmented by Oxidative Stress in Endometriosis. *Ann. Lab. Med*. 2020;40:390–397. doi: <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.5.390>
8. Hypothetical roadmap towards endometriosis: prenatal endocrine-disrupting chemical pollutant exposure, anogenital distance, gut-genital microbiota and subclinical infections / P. García-Peñarrubia et al. *Human Reproduction Update*. 2020. Vol. 26, no. 2. P. 214–246. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz044>
9. Gruber TM, Mechsner S. Pathogenesis of Endometriosis: The Origin of Pain and Subfertility. *Cells*. 2021. Vol.10, no.6. P.1381. doi: <https://doi.org/10.3390/cells10061381>
10. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*. 2020. Vol. 30, no. 6. P.492–506. doi: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
11. Gut microbiota and systemic immunity in health and disease / BC Lo et al. *International Immunology*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa079>
12. Punzón-Jiménez P., Labarta E. The impact of the female genital tract microbiome in women's health and reproduction: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02247-5>

12. Punzón-Jiménez P, Labarta E. The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02247-5>
13. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility / R. Tomaiuolo et al. *High-Throughput*. 2020. Vol.9, no.2. P.12. doi: <https://doi.org/10.3390/ht9020012>
14. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2018;58:341–348. doi: <https://doi.org/10.1111/ajo.12754>
15. The Vaginal Microbiome as a Tool to Predict rASRM Stage of Disease in Endometriosis: a Pilot Study / A. R. Perrotta et al. *Reproductive Sciences*. 2020. Vol.27, no.4. P.1064–1073. doi:<https://doi.org/10.1007/s43032-019-00113-5>
16. Schoenmakers S., Laven J. The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2020. Vol. 32, no.3. P.169–178. doi:<https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000626>
17. P–399 Temporal dynamics of an IVF/ICSI success prediction test based on the vaginal microbiome / A. Bielfeld et al. *Human Reproduction*. 2021. Vol. 36, Supplement_1. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/deab130.398>
18. García-Velasco JA, Budding D, Campe H, Malfertheiner SF, Hamamah S, Santjohanser C, et al. The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod BioMed Online*. 2020;41:443–453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.014>
19. Giordano G., Ferioli E., Tafuni A. The Role of Mesothelin Expression in Serous Ovarian Carcinoma: Impacts on Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets. *Cancers*. 2022. Vol. 14, no. 9. P. 2283. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers14092283>
20. Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis–When Does It Happen? / L. Konrad et al. *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol.9, no.6. P.1915. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9061915>
21. Mesothelial cells regulate immune responses in health and disease: role for immunotherapy in malignant mesothelioma / S. E. Mutsaers et al. *Current Opinion in Immunology*. 2020. Vol.64. P.88–109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.04.005>
22. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020. P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1843628>
23. NLRP3 inflammasome-mediated Pyroptosis induce Notch signal activation in endometriosis angiogenesis / M. Zhang et al. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2023. P. 111952. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111952>
24. Effectiveness of NLRP3 Inhibitor as a Non-Hormonal Treatment for ovarian endometriosis / M. Murakami et al. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2022. Vol. 20, no.1. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00924-3>
25. Potential of *Lactobacillus acidophilus* to modulate cytokine production by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis / F. Mehdizadeh Sari et al. *Iranian Journal of Microbiology*. 2022. doi: <https://doi.org/10.18502/ijm.v14i5.10965>
26. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: residents, tourists, or invaders? *Front Immunol*. 2018;9:1–16. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
27. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota—new player in town. *Fertil Steril*. 2017;108:32–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.034>
28. Schoenmakers S, Laven J. The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2020;32:169–178. doi: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000626>
29. García-Velasco JA, Budding D, Campe H, Malfertheiner SF, Hamamah S, Santjohanser C, et al. The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod BioMed Online*. 2020;41:443–453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.014>
30. Sepideh Khodaverdi, Robabeh Mohammadbeigi, Mojdeh Khaledi et al, Beneficial Effects of Oral *Lactobacillus* on Pain Severity in Women Suffering from Endometriosis: A Pilot Placebo-Controlled Randomized Clinical Trial. 2019 Oct;13(3):178-183. doi: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5584>
31. Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, Tao X, Landis J, Zhan Y, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33:129–136. doi: <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
32. Uterine deficiency of high-mobility group box-1 (HMGB1) protein causes implantation defects and adverse pregnancy outcomes / S. Aikawa et al. *Cell Death & Differentiation*. 2019. Vol. 27, no. 5. P. 1489–1504. doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0429-z>
33. Regulatory mechanisms of HMGB1 and its receptors in polycystic ovary syndrome-driven gravid uterine inflammation / M. Hu et al. *The FEBS Journal*. 2022. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16678>

13. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility / R. Tomaiuolo et al. *High-Throughput*. 2020. Vol.9, no.2. P.12. doi: <https://doi.org/10.3390/ht9020012>
14. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2018;58:341–348. doi: <https://doi.org/10.1111/ajo.12754>
15. The Vaginal Microbiome as a Tool to Predict rASRM Stage of Disease in Endometriosis: a Pilot Study / AR Perrotta et al. *Reproductive Sciences*. 2020. Vol. 27, no. 4. P.1064–1073. doi: <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00113-5>
16. Schoenmakers S., Laven J. The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2020. Vol. 32, no. 3. P.169–178. doi: <https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000626>
17. P-399 Temporal dynamics of an IVF/ICSI success prediction test based on the vaginal microbiome / A. Bielfeld et al. *Human Reproduction*. 2021. Vol. 36, Supplement_1. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/deab130.398>
18. García-Velasco JA, Budding D, Campe H, Malfertheiner SF, Hamamah S, Santjohanser C, et al. The reproductive microbiome □ clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod BioMed Online*. 2020;41:443–453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.014>
19. Giordano G., Ferioli E., Tafuni A. The Role of Mesothelin Expression in Serous Ovarian Carcinoma: Impacts on Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets. *Cancers*. 2022. Vol. 14, no. 9. P. 2283. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers14092283>
20. Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometriosis–When Does It Happen? / L. Konrad et al. *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol.9, no.6. P. 1915. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9061915>
21. Mesothelial cells regulate immune responses in health and disease: role for immunotherapy in malignant mesothelioma / SE Mutsaers et al. *Current Opinion in Immunology*. 2020. Vol. 64. P.88–109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.04.005>
22. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020. P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1843628>
23. NLRP3 inflammasome-mediated Pyroptosis induces Notch signal activation in endometriosis angiogenesis / M. Zhang et al. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2023. P. 111952. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111952>
24. Effectiveness of NLRP3 Inhibitor as a Non-Hormonal Treatment for ovarian endometriosis / M. Murakami et al. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2022. Vol. 20, no. 1. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00924-3>
25. Potential of *Lactobacillus acidophilus* to modulate cytokine production by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis / F. Mehdizadeh Sari et al. *Iranian Journal of Microbiology*. 2022. doi: <https://doi.org/10.18502/ijm.v14i5.10965>
26. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: residents, tourists, or invaders? *Front Immunol*. 2018;9:1–16. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
27. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota — a new player in town. *Fertil Steril*. 2017;108:32–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.034>
28. Schoenmakers S, Laven J. The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2020;32:169–178. doi: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000626>
29. García-Velasco JA, Budding D, Campe H, Malfertheiner SF, Hamamah S, Santjohanser C, et al. The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod BioMed Online*. 2020;41:443–453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.014>
30. Sepideh Khodaverdi, Robabeh Mohammadbeigi, Mojdeh Khaledi et al., Beneficial Effects of Oral *Lactobacillus* on Pain Severity in Women Suffering from Endometriosis: A Pilot Placebo-Controlled Randomized Clinical Trial. 2019 Oct;13(3):178-183. doi: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5584>
31. Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, Tao X, Landis J, Zhan Y, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33:129–136. doi: <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
32. Uterine deficiency of high-mobility group box-1 (HMGB1) protein causes implantation defects and adverse pregnancy outcomes / S. Aikawa et al. *Cell Death & Differentiation*. 2019. Vol. 27, no. 5. P. 1489–1504. doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0429-z>
33. Regulatory mechanisms of HMGB1 and its receptors in polycystic ovary syndrome-driven gravid uterine inflammation / M. Hu et al. *The FEBS Journal*. 2022. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16678>
34. Koval H, Chopiak V, Kamyshnyi A. mRNA tlr2 and tlr4 expression in the endometrium tissue in women with endometriosis associated with infertility. *Georgian Med News*. 2015 Jul-Aug;(244-245):7-11. PMID: 26177128.

34. Koval H, Chopiak V, Kamyshnyi A. mRNA tlr2 and tlr4 expression in the endometrium tissue in women with endometriosis associated with infertility. *Georgian Med News*. 2015 Jul-Aug;(244-245):7-11. PMID: 26177128.
35. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:195–202. doi: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.222>
36. Deng M, Tang Y, Li W, Wang X, Zhang R, Zhang X, et al. The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-dependent lethality in sepsis. *Immunity*. 2018;49:740–53 e7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.016>

35. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8:195–202. doi: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.222>
36. Deng M, Tang Y, Li W, Wang X, Zhang R, Zhang X, et al. The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-dependent lethality in sepsis. *Immunity.* 2018;49:740–53 e7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.016>