

Оригинальная статья
УДК 618.177-089.888.11
<https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-3-5-15>

Вагинальный и эндометриальный микробиом: оценка, влияние на имплантацию эмбриона

И.И. Куценко¹, И.О. Боровиков¹, Е.И. Кравцова¹, В.П. Булгакова¹, О.И. Боровикова¹,
Р.В. Черемных¹, А.А. Андреева¹, М.И. Боровиков²

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

²Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия

Автор, ответственный за переписку: Игорь Олегович Боровиков, bio2302@mail.ru

Аннотация. Цель: оценка микробиома влагалища и полости матки с использованием маточного катетера с цанговой направляющей у infertильных пациенток перед проведением процедуры экстракорпорального оплодотворения. **Материалы и методы:** были взяты и изучены образцы вагинального и эндометриального соскобов, полученные от 73 infertильных женщин, запланировавших процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Образцы были проанализированы областями V3-V4-V6 с помощью метода секвенирования гена 16S рРНК. **Результаты:** обнаружены существенные различия в таксономии эндометрия и вагинального микробиома. Совпадения по микробиологическому составу выявлены у 18,2% пациенток. Эндометриальные лактобацилло-доминантные микробиоценозы встречались у 24,8% женщин, вагинальные — у 56,7%. Сравнение между пациентками с отрицательными и положительными результатами ЭКО (наступление биологической беременности) не смогло идентифицировать какой-либо микроорганизм, связанный с успехом процедуры, при этом биоразнообразие микробиоты эндометрия было выше среди женщин, успешно реализовавших свою репродуктивную функцию. Индекс равноправия Шеннона (J) у беременных и небеременных женщин составил 0,76 (0,57–0,87) и 0,55 (0,51–0,64) соответственно (p=0,002). **Заключение:** использование разработанного маточного катетера с цанговой направляющей для адекватной оценки микробиома эндометрия является перспективным и обоснованным. Правильная оценка эндометриального микробиоценоза способствует адекватной диагностике патологических процессов, происходящих в полости матки, что позволит провести правильную терапию, направленную на повышение рецептивности эндометрия и в дальнейшем способствовать реализации репродуктивной функции женщины.

Ключевые слова: эндометриальный микробиом, infertильность, секвенирование гена 16S рРНК, экстракорпоральное оплодотворение, двухпросветный маточный зонд с цангой.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Куценко И.И., Боровиков И.О., Кравцова Е.И., Булгакова В.П., Боровикова О.И., Черемных Р.В., Андреева А.А., Боровиков М.И. Вагинальный и эндометриальный микробиом: оценка, влияние на имплантацию эмбриона. *Медицинский вестник Юга России*. 2023;14(3):5-15. DOI 10.21886/2219-8075-2023-14-3-5-15.

Vaginal and endometrial microbiome: evaluation, effect on embryo implantation

I.I. Kutsenko¹, I.O. Borovikov¹, E.I. Kravtsova¹, V.P. Bulgakova¹, O.I. Borovikova¹, R.V. Cheremnykh¹,
A.A. Andreeva¹, M.I. Borovikov²

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

²Kuban State Technological University, Krasnodar, Russia

Corresponding author: Igor O. Borovikov, bio2302@mail.ru

Abstract. Objective: assessment of the microbiome of the vagina and uterine cavity using a uterine catheter with a collet guide in infertile patients before the in vitro fertilization procedure. **Materials and methods:** samples of vaginal and endometrial scrapings obtained from 73 infertile women who had planned an in vitro fertilization (IVF) procedure were taken and studied. The samples were analyzed by V3-V4-V6 regions using the 16S rRNA gene sequencing method. **Results:** significant differences were found in the taxonomy of the endometrium and vaginal microbiome - coincidences in microbiological composition were detected in 18.2% of patients. Endometrial lactobacillus-dominant microbiocenoses occurred in 24.8% of women, vaginal — in 56.7%. Comparisons between patients with negative and positive IVF (onset of biological pregnancy) results failed to identify any microorganism associated with the success of the procedure, with endometrial microbiota biodiversity being higher among women who successfully exercised their reproductive function. The Shannon Equality Index (J) for pregnant and non-pregnant women was 0.76 (0.57–0.87) and 0.55 (0.51–0.64), respectively (p=0.002). **Conclusion:** the use of a developed uterine catheter

© И.И. Куценко, И.О. Боровиков, Е.И. Кравцова, В.П. Булгакова, О.И. Боровикова, Р.В. Черемных, А.А. Андреева, М.И. Боровиков, 2023

with a collet guide for an adequate assessment of the endometrial microbiome is promising and justified. The correct assessment of the endometrial microbiocenosis contributes to the adequate diagnosis of pathological processes occurring in the uterine cavity, which will allow for proper therapy aimed at increasing the receptivity of the endometrium and, in the future, contributing to the realization of the reproductive function of a woman.

Keywords: endometrial microbiome, infertility, 16S rRNA gene sequencing, in vitro fertilization, two-lumen uterine probe with collet.

Financing. The study did not have sponsorship.

For citation: Kutsenko I.I., Borovikov I.O., Kravtsova E.I., Bulgakova V.P., Borovikova O.I., Cheremnykh R.V., Andreeva A.A., Borovikov M.I. Vaginal and endometrial microbiome: evaluation, effect on embryo implantation. *Medical Herald of the South of Russia*. 2023;14(3):5-15. DOI 10.21886/2219-8075-2023-14-3-5-15

Введение

Репродуктивный микробиом является новой темой в области акушерства и гинекологии [1–6]. В частности, особый интерес представляет микробиом полости матки, а именно эндометрия — анатомической ниши, где микроорганизмы с низким содержанием биомассы могут модулировать местную иммунную среду [7]. Интерес в первую очередь обусловлен влиянием микробиоты на имплантацию эмбриона и формирование плаценты, что потенциально влияет на фертильность и развитие акушерских осложнений [2, 4, 8, 9]. Недавние исследования показали, что в контексте экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) микробиота эндометрия, в которой не доминируют лактобациллы (определяемая как <90% *Lactobacillus spp.*) была связана со значительным снижением показателей имплантации, беременности и живорождений [10–12].

Основанные на секвенировании методы обнаружения бактерий в настоящее время являются краеугольным камнем оценки микробиома в анатомических участках с низкой биомассой. Эти методы метабаркодирования основаны на амплификации и секвенировании бактериального гена рибосомальной РНК 16S (рРНК), содержащего девять гипервариабельных областей (V1–V9), что позволяет различать и количественно оценивать различные виды микробов, присутствующие в конкретном образце [13–15]. Существенным ограничением в исследовании эндометриального микробиома являются применяемые в настоящее время методы забора проб для его анализа, которым до сих пор не уделяется достаточного внимания. При этом данные процедуры обладают одним общим недостатком, а именно возможностью контаминации образцов эндометрия цервикальными или вагинальными микроорганизмами, то есть контаминацией из анатомических областей с высокой биомассой и плотностью микроорганизмов (на 10^7 и 10^5 и выше, чем в эндометрии), что может полностью нивелировать результаты исследований [4, 10, 16]. Соответственно проведенные исследования, изучавшие микробиом эндометрия с использованием трансцервикального катетера для отбора проб и исследования с использованием гистообразца эндометрия, полученного при гистерэктомии и достигающего полости эндометрия, показали радикально разные результаты как с точки зрения плотности микроорганизмов, так и колонизирующих видов [1, 17–20].

В настоящем исследовании мы предлагаем для получения образцов эндометрия и оценки микробиоты использовать двуполостные маточные катетеры с кангвой

направляющей собственной модификации, обычно используемые для переноса эмбрионов. Ожидается, что эта система маточного катетера уменьшит возможную контаминацию микроорганизмами шейки матки и влагалища. Чтобы исследовать достоверность этой модальности сбора образцов, мы сравнили микробиоты эндометрия и влагалища у инфертильных женщин, запланировавших процедуру ЭКО и перенос замороженных эмбрионов. В качестве вторичной цели мы также оценили связь полученной микробиоты с последующей вероятностью беременности.

Цель исследования — оценка микробиома влагалища и полости матки с использованием маточного катетера с кангвой направляющей у инфертильных пациенток перед проведением процедуры экстракорпорального оплодотворения.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 73 женщины (средний возраст — $34,1 \pm 3,7$ лет) с инфертильностью перед подготовкой к циклу ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ), имеющие бластоцисты для криопереноса в 5 центрах репродукции г. Краснодара (Клиника Кубанского государственного медицинского университета (КубГМУ), центр планирования семьи Краевого перинатального центра Детской краевой клинической больницы (ДККБ), центр репродукции клиники «Екатерининская», клиника мужского и женского здоровья «ОХУ-center», клиника репродукции «Эмбрио») в период с 01.2021 по 01.2023 гг. (табл. 1).

Критерии исключения: 1) текущий диагноз «Воспалительное заболевание органов малого таза» (ВЗОМТ); 2) наличие гидросальпинкса; 3) клинически значимые аномалии полости эндометрия, включая миому, полипы эндометрия и маточную перегородку, синдром Ашермана; 4) проведенная в течение последнего месяца антибактериальная терапия; 5) гормональное лечение (прогестины, эстропрогестины или гонадотропины) в течение последнего месяца; 6) аномальное маточное кровотечение; 7) перенос эмбрионов, запланированный в том же менструальном цикле. Женщины, согласившиеся на участие, были проинформированы о цели исследования, возможном дискомфорте процедуры и возможных рисках и подписали информированное согласие.

Образцы из полости матки для микробиологического исследования брались у женщин, находящихся в литотомическом положении на гинекологическом кресле с осмотром в зеркалах (типа Куско) между 15 и 25

Исходная характеристика пациенток
Initial characteristics of patients

Данные / data	n=73	ДИ / IQR; %
Возраст (лет) / age (years)	34,1	27–38
ИМТ / BMI (kg/m ²)	26,3	19,9–28,2
Курение / smoking	17	23,3
АМГ / AMG (ng/ml)	2,34	2,23–3,65
Предыдущая беременность / previous pregnancy	55	75,3
Предыдущие живорождения / previous live births	32	43,8
Продолжительность бесплодия (лет) / duration of infertility (years)	3	2–7
Причина бесплодия / cause of infertility		
Мужской фактор / male factor	9	12,3
Трубный фактор / pipe factor	7	9,6
Эндометриоз / endometriosis	11	15,1
Идиопатическое бесплодие / idiopathic infertility	37	50,7
Смешанный / mixed	9	12,3
Количество попыток ЭКО / number of IVF attempts		
1	5	6,8
2	11	15,1
≥3	57	78,1
Подготовка эндометрия к переносу / preparation of the endometrium for transfer		
ЗГТ / HRT	21	28,8
Природный цикл / natural cycle	52	71,2

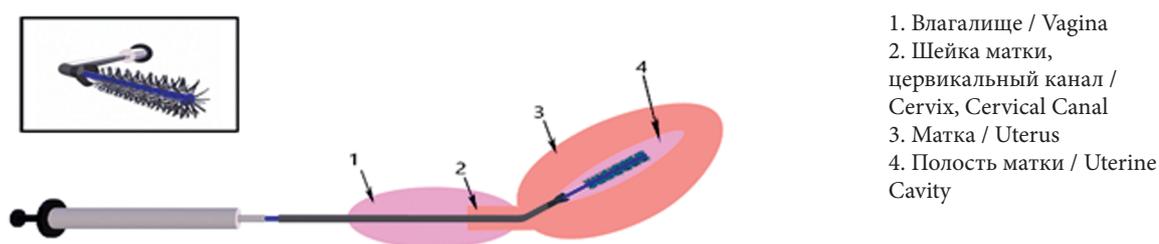


Рисунок 1. Маточный двухпросветный цанговый зонд для отбора проб эндометрия
Figure 1. Uterine double-lumen collet probe for endometrial sampling

Примечание: наружный полый катетер (представленный серым цветом) совмещается с дистальной цервикального канала, затем, после раскрытия цанги, внутренний зонд с меньшим диаметром (представленный синим цветом) проходит через первый и собирает соскоб эндометрия, избегая контактов со слизистыми оболочками влагалища и шейки матки (приоритетная справка на изобретение №2022127503/14(060304) от 21.10.2022).

Note: the outer hollow catheter (represented in gray) is combined with the distal cervical canal, then, after the opening of the collet, an internal probe with a smaller diameter (represented in blue) passes through the first and collects the scraping of the endometrium, avoiding contact with the mucous membranes of the vagina and cervix (priority reference for invention No. 2022127503/14 (060304) of 21.10.2022).

днями естественного менструального цикла. Отбор проб производился с трансабдоминальной ультразвуковой визуализацией. Сначала брался образец вагинальной микрофлоры с заднего свода влагалища (стерильный тампон), затем, после удаления цервикальной слизи стерильным тампоном, максимально избегая контакта со стенками влагалища и нестерильными поверхностями, вводился маточный двухпросветный канальный зонд, проводился забор материала эндометрия, после чего проводилось закрытие канги и зонд извлекался (рис. 1).

Содержимое зонда суспендировали в 150 мкл стерильного физиологического раствора, предварительно приготовленного в 1 мл стерильной пробирки Эппендорфа, затем дистальную часть катетера (2–3 мм) отламывали и опускали внутрь пробирки вместе с физиологическим раствором (пробирку хранили при температуре -80°C).

На момент оценки образцы из влагалища и полости матки размораживали и выделяли бактериальную ДНК для её исследования методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «Фемофлор-16» (ООО «НПО ДНК-Технология», РФ): ДНК выделяли из 100 мкл пробы с использованием набора реагентов «Проба-ГС». Этот тест позволяет одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты микрофлоры, ассоциированной с бактериальным вагинозом: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides fragilis*, а также *Lactobacillus* spp. (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*). Анализ обеспечивает автоматическую интерпретацию микрофлоры с использованием количественного анализа.

Секвенирование 16S рРНК бактериальных генов выполняли с использованием набора раствора микробиоты В для гипервариабельных областей V3-V4-V6 путём использования дегенеративных праймеров, включающих в себя 2 исследования: EMMA® (Endometrial Microbiome Metagenomic Analysis — анализ микрофлоры эндометрия для оценки репродуктивного прогноза) и ALICE® (Analysis of Infectious Chronic Endometritis — анализ патогенной микрофлоры эндометрия («Igenomix», Spain)) [14, 15]. Полученная амплификация гипервариабельных областей V3-V4-V6 позволяет идентифицировать большинство бактериальных популяций, присутствующих в микробиоте. Данные секвенирования анализировались автоматически с помощью программного обеспечения MicroBAT (Microbiota analysis Tool, Igenomix, Spain), предоставляющего отчёт для каждого образца с назначением операционных таксономических единиц (OTU).

Данные анализировались с помощью программного обеспечения Statistical Package for Social Sciences (SPSS 23.0, IL, США). Данные были представлены как число (%), среднее \pm SD или медиана (межквартильный диапазон (interquartile range) — IQR). Сравнения проводились с использованием Т-критерия Стьюдента, непараметрического критерия Фишера (значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми). Относительная доля различных бактериальных родов была рассчитана с использованием в качестве знаменателя только общего числа информативных считываний. Микробиом эндометрия считался

лактобацилло-доминантным, если относительное содержание *Lactobacillus* превышало 90%. Индекс Шеннона (SH) и индекс эквивалентности Шеннона был рассчитан программным обеспечением MicroBAT.

Исследование было одобрено Этическим комитетом КубГМУ (протокол №17 от 12.01.2021) и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией (пересмотр 2013, Бразилия), правилами Надлежащей клинической практики (GCP; 2016, Астана) и клинической практики в РФ (приказ МЗ РФ №200н, 2016). Обследование пациенток проводилось согласно приказам МЗ РФ №1130н от 20.10.2020 г. «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология», №803н от 31.07.2020 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (2021).

Результаты

Межквартильный диапазон (IQR) — общее число показаний последовательностей для эндометрия и вагинальных образцов составило 2583 (385–6083) и 3822 (910–6920) соответственно, IQR-индексы Шеннона для них составили 2,73 (2,49–3,17) и 1,70 (1,44–2,22) ($p < 0,001$), IQR-индексы эквивалентности Шеннона — 0,57 (0,52–0,74) и 0,44 (0,40–0,53) ($p < 0,001$). Преобладание лактобациллярной микрофлоры отмечено в 30,1% (22/73) эндометриальных и 53,4% (39/73) вагинальных образцов; у 86,3% (19/22) женщин, у которых *Lactobacillus* spp. был наиболее распространённым видом в образцах эндометрия, также имели *Lactobacillus* в качестве наиболее распространённого вида во влагалищных образцах. Пациентки, микрофлору которых можно было классифицировать как *Lactobacillus-dominantus* (*Lactobacillus* >90%), выявлены в 8,2% (6/73) эндометриальных и 41,1% (30/73) вагинальных образцов (индекс корреляции Спирмена между долей *Lactobacillus* spp. в эндометриальных и вагинальных образцах составил $Rho = 0,53$, $p < 0,001$ — слабая корреляция) (табл. 2).

Доминантные бактериальные роды микробиоты эндометрия и влагалища совпали только у 9,6% (7/73) женщин. Для эндометрия наиболее распространёнными бактериальными родами были *Lactobacillus*, *Pelomonas*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* и *Escherichia coli* (табл. 2-3). Для влагалища это были *Lactobacillus*, *Gardnerella* и *Bifidobacterium*.

При этом данные мультиплексной ПЦР-РВ в эндометриальных образцах существенно не совпадали с результатами 16srРНК секвенирования, что представляется логичным, так как система ПЦР-детекции в первую очередь направлена на обнаружение микрофлоры, ответственной за развитие бактериального вагиноза и не является тропной к эндометрию (табл. 3).

Результаты

Далее 89,0% (65/73) пациенткам произведён перенос размороженных эмбрионов 3–5 дня (8 женщинам перенос был отменён, так как не была достигнута оптимальная толщина эндометрия). Регистрировалась лишь клиническая беременность (визуализация сердечной

Таблица / Table 2

Наиболее распространённые роды бактерий в микробиоте эндометрия и влагалища
The most common types of bacteria in the endometrial and vaginal microbiota

Место Place	Вид Species	Встречаемость Prevalence >1%	Встречаемость Prevalence (%; ди)	Наиболее часто встречаемые роды Most prevalent species	Доминирующие роды Dominant species (>90%)
endometrium	Lactobacillus	61 (83,6%)	13 (3-37)	22 (30,1%)	6 (8,2%)
	Propionibacterium	54 (74,0%)	7 (4-14)	3 (4,1%)	0 (0,0%)
	Pelomonas	51 (69,9%)	6 (2-9)	6 (8,2%)	0 (0,0%)
	Pseudomonas	46 (63,0%)	8 (2-14)	4 (5,5%)	0 (0,0%)
	Streptococcus	38 (52,0%)	2 (1-3)	2 (2,7%)	0 (0,0%)
	Escherichia coli	37 (50,7%)	4 (1-11)	6 (8,2%)	3 (4,1%)
vagina	Lactobacillus	68 (93,1%)	83 (27-99)	39 (53,4%)	30 (41,1%)
	Gardnerella	23 (31,5%)	31 (15-62)	11 (15,1%)	4 (5,5%)
	Bifidobacterium	17 (23,3%)	50 (8-87)	9 (12,3%)	5 (6,8%)

деятельности на 6-й неделе), которая наблюдалась у 31,5% (23/73) женщин, живорождение — у 24,7% (18/73) пациенток (у 5,5% (4/73) произошел самопроизвольный выкидыш, у 6,8% (5/73) — преждевременные роды (22–36 недель гестации), остальные 19,2% (14/73) родоразрешены в доношенном сроке беременности).

Из 23 женщин с успешным результатом ЭКО (параметр — наступившая клиническая беременность) преобладание лактобациллярной микрофлоры в эндометриальных и вагинальных пробах было отмечено у 11 (47,8%) – 2 (8,7%) в эндометрии и 9 (39,1%) — во влагалище ($p=0,16$). При этом не отмечено существенных различий между группами с положительным и отрицательным результатами ЭКО: индекс Шеннона для образцов эндометрия между беременными и небеременными женщинами составил 2,41 (1,12–3,90) и 3,29 (2,84–3,82) ($p=0,036$) соответственно, индекс эквитабельности Шеннона — 0,76 (0,57–0,87) и 0,55 (0,51–0,64) ($p=0,002$), что может свидетельствовать о более высоком биоразнообразии в связи с установлением беременности, но, учитывая количество выборки, не является достоверным (рис. 1–2).

Статистически значимая разница выявилась для обоих индексов в микробиомах эндометрия ($p=0,036$ и $p=0,002$ соответственно), и, наоборот, никаких существенных различий для вагинальных микробиомов не наблюдалось.

Обсуждение

Небеременные результаты данного исследования с использованием авторского метода получения проб эндометрия позволили выявить существенные различия в таксономии между составом эндометрия и вагинального микробиома, что подтверждает его обоснованность. При этом не получено подтверждения о выраженном положительном влиянии доминирования лактобациллярной микрофлоры эндометрия на успех ЭКО, как и об отрицательном влиянии условно-патогенной флоры, ответственной за развитие локальных генитальных дисбиозов. Интересно, что мы наблюдали более высокие показатели индексов Шеннона среди женщин с положительным

результатом переноса эмбриона (наступления клинической беременности).

Влагалище и шейка матки являются областями с высоким содержанием биомассы, что обуславливает в большинстве случаев значительную контаминацию биоматериала при их прохождении (концентрация микроорганизмов в шейке матки оценивается, как в 10^5 более высокое, чем в эндометрии), что и является существенным ограничением в оценке эндометриального микробиоценоза, что обуславливает актуальность поиска новых методов трансцервикального сбора биоматериала [10]. При этом наша оценка состава микробиома эндометрия и влагалища и, что особенно важно, оценка её влияния на результативность программ ЭКО, во многом отличается от данных других исследователей [1]. При этом как нами, так и большинством авторов не ставится под сомнение сходство между вагинальным и эндометриальным микробиоценозом, что обусловлено их взаимозависимостью и близостью расположения, но, по нашему мнению, наблюдение различий является доводом в пользу точности нашей техники отбора проб.

До настоящего времени в клинической практике были попытки преодолеть контаминацию цервикально-вагинальным содержимым образцов эндометрия. Liu et al. (2019) использовали катетер с двойной оболочкой для получения образца эндометрия [21]. Зарегистрированные ими результаты о более выраженной контаминации эндометрия по сравнению с вагинальными образцами *Lactobacillus* неоднозначны. При этом другие исследователи (Carosso et al., 2020), которые использовали двухпросветные катетеры для переноса эмбрионов, показали среднюю частоту *Lactobacillus* (27%), что коррелирует с результатами большинства исследований [22]. Так, Verstraelen et al. (2016) использовали трансцервикальное устройство с силиконовой щеточкой в оболочке и предназначенное для сбора гистобразцов эндометрия и не смогли показать доминирование *Lactobacillus* в его микробиоме, при этом сообщается о довольно «грубом» воздействии данной щеточки, нарушающей целостность эндометрия [23]. Qiu et al.

Таблица / Table 3

Сравнительные результаты микробиоты эндометрия
Comparative results of the endometrial microbiota

Пациент Patient №№	PCR-RT (femoflor-16®)	rRNA 16s (EMMA®; ALICE®)
	Отрицательный исход ЭКО Negative outcome of IVF	
1	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.
2	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>E. coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>E. coli</i>
3	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
4	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	<i>E. coli</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Prevotella</i>
5	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i>
6	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Propionibacterium</i>
7	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
8	negative	<i>Streptococcus</i> , <i>Pelomonas</i>
9	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i>
10	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Propionibacterium</i>
11	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Megasphaera</i>
12	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i>
13	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
14	negative	<i>Bifidobacterium</i>
15	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Pelomonas</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i>
16	negative	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pelomonas</i>
17	<i>Lactobacillus</i> spp.	negative
18	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Megasphaera</i>
19	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
20	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
21	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Ureaplasma</i>	<i>Bifidobacterium</i>
22	negative	<i>Lactobacillus</i> spp.
23	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>
24	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
25	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Megasphaera</i>
26	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Propionibacterium</i>
27	<i>Staph. spp.</i> , <i>Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i>
28	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
29	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staph. spp.</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
30	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i>
31	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
32	<i>Lactobacillus</i> spp.	negative
33	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>C. albicans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i>
34	negative	<i>Prevotella</i>
35	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
36	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
37	<i>G. vaginalis</i> , <i>Pelomonas</i>	<i>Propionibacterium</i> , <i>Pelomonas</i>
38	negative	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Prevotella</i>
39	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Veillonella</i>

Пациент Patient №№	PCR-RT (femoflor-16®)	rRNA 16s (EMMA®; ALICE®)
	Отрицательный исход ЭКО Negative outcome of IVF	
40	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
41	<i>Lactobacillus spp., E. coli</i>	negative
42	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
43	<i>Lactobacillus spp., Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillus spp., Enterococcus spp.</i>
44	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Propionibacterium</i>
45	<i>Lactobacillus spp., Pelomonas</i>	<i>Megasphaera</i>
46	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
47	<i>Lactobacillus spp., Ureaplasma</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
48	<i>Lactobacillus spp.</i>	negative
49	<i>Lactobacillus spp., E. coli</i>	<i>Lactobacillus spp., Veillonella</i>
50	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
	Положительный исход ЭКО (клиническая беременность) Positive outcome of IVF (clinical pregnancy)	
51	<i>Lactobacillus spp., Strept. spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Streptococcus</i>
52	<i>Lactobacillus spp., Pelomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
53	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Propionibacterium</i>
54	<i>Streptococcus spp., Pelomonas</i>	<i>Streptococcus, Megasphaera</i>
55	<i>Enterococcus spp., Candida albicans</i>	<i>Enterococcus spp., Streptococcus</i>
56	<i>Lactobacillus spp., Staphylococcus spp</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
57	<i>Enterococcus spp., Ureaplasma</i>	<i>Enterococcus spp., Bifidobacterium</i>
58	<i>Lactobacillus spp., E. coli, Staph. spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Staphylococcus</i>
59	<i>Ureaplasma, Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus spp., Prevotella</i>
60	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
61	<i>Lactobacillus spp., Enterococcus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Megasphaera</i>
62	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Pelomonas</i>
63	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
64	<i>Lactobacillus spp., Pelomonas</i>	<i>Bifidobacterium</i>
65	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
66	<i>E. coli, Pelomonas</i>	<i>Lactobacillus spp., Pelomonas</i>
67	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
68	<i>Staph. spp., Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus spp., Staphylococcus</i>
69	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
70	<i>Lactobacillus spp., Staph. spp.</i>	negative
71	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp., Bifidobacterium</i>
72	<i>Lactobacillus spp., Enterobacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
73	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>

(2021) которые выполняли с целью обхода контаминации гистероскопический забор образцов, сообщали о еще более низкой частоте обнаружения *Lactobacillus* — 7% (существенным недостатком данного метода является его сложность и инвазивность) [24]. Таким образом, до настоящего времени наиболее успешным было использование двухпросветных катетеров для переноса

эмбрионов [25, 26]. Но при этом методе всё же существует риск загрязнения при прохождении внутреннего катетера через наружный. Используемая нами модель за счёт открытия/закрытия цангового механизма помогает преодолеть этот риск.

Также мы попытались провести параллели между составом микробиома эндометрия и результативностью

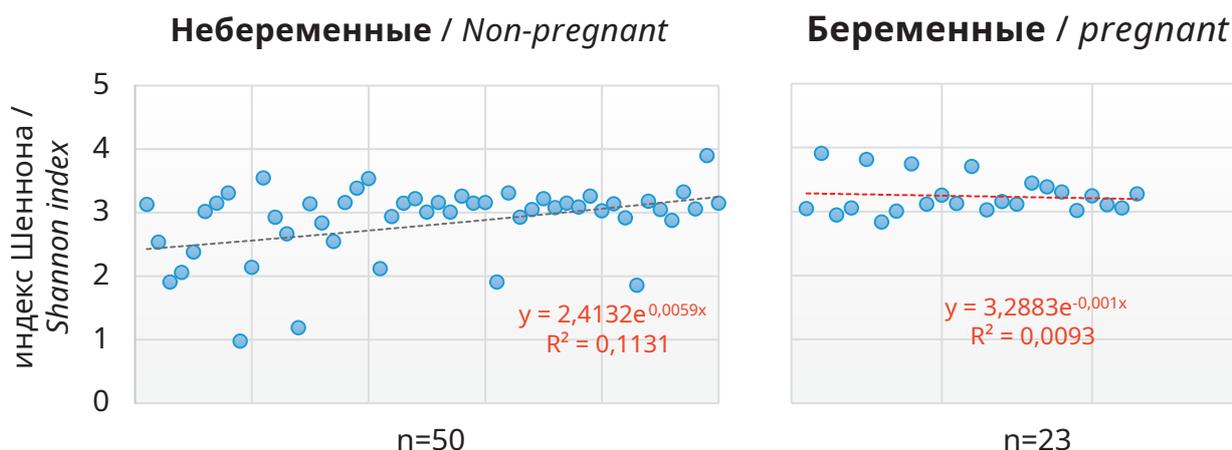


Рисунок 2. Индекс Шеннона в образцах эндометрия
Figure 2. Shannon index in endometrial samples

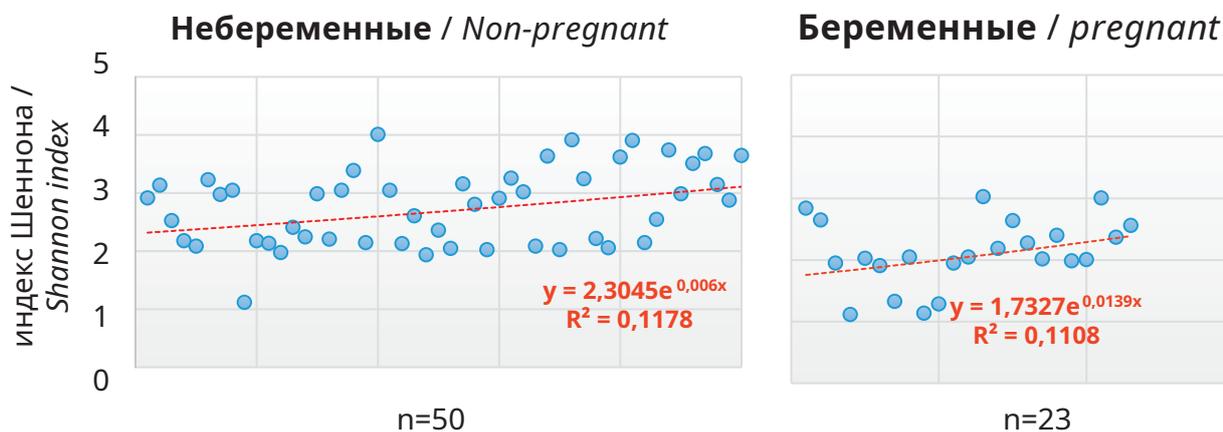


Рисунок 3. Индекс Шеннона в вагинальных образцах
Figure 3. Shannon index in vaginal samples

ЭКО, но полученные результаты имели некоторый контраст с другими исследованиями [12]. Особое значение имеет скудная частота лактобацил-доминантных случаев у наших пациенток и отсутствие связи состава эндометриальной микробиоты с результатами ЭКО. При этом результаты данного исследования не ставят под сомнение выводы Moreno et al. (2016) о связи доминирования лактофлоры и положительным результатом, но ставят под сомнение тот факт, что у этих авторов действительно были данные о микробиоме эндометрия (более правдоподобно, что их выводы были сделаны на основании оценки цервикальной микрофлоры). Интересным и неожиданным результатом нашего исследования является связь между более высоким альфа-разнообразием и вероятностью наступления беременности в протоколах ЭКО: 2 показателя разнообразия (индексы Шеннона и эквитабельности) выявили статистически значимые различия между женщинами с положительными

и отрицательными результатами переноса эмбрионов. При этом, по нашему мнению, необходимо провести дальнейшие исследования по оценке биоразнообразия микробиоты эндометрия и его роли в реализации фертильности.

Наконец, данные использования мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (фемофлор 16) указывают на то, что этот метод не совсем подходит для анализа образцов эндометрия, но при этом способен подтвердить различия между вагинальными и эндометриальными колонизирующими микроорганизмами.

Заключение

Наши данные подтвердили эффективность использования двухпросветных зондов с канальным механизмом для тестирования микробиома эндометрия, что создает новые перспективы как для изучения его биоразнообразия, так и для определения его роли в рецептивности эндометрия и, соответственно, женской фертильности.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Базанов П.А., Кузнецова И.А., Павлухина С.С., Горская О.С., Митюшина Н.Г. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с хроническим эндометритом после лечения путем нормализации локальной экспрессии факторов врожденного иммунитета. *Проблемы репродукции*. 2020;26(5):8690. Bazanov P.A., Kuznetsova I.A., Pavlukhina S.S., Gorskaya O.S., Mityushina N.G. The effectiveness of ART programs in patients with chronic endometritis after treatment by normalizing the local expression of innate immunity factors. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2020;26(5):8690. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/repro20202605186>
2. Benner M, Ferwerda G, Joosten I, van der Molen RG. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum Reprod Update*. 2018;24(4):393-415. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy012>
3. Agostinis C, Mangogna A, Bossi F, Ricci G, Kishore U, Bulla R. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol*. 2019;10:2387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02387>
4. Глухова Е.В., Шаховская И.Н. Микробиологическая характеристика биотопов репродуктивного тракта при эндометрите. Тольяттинский медицинский консилиум. 2021;1(2):38-44. Glukhova E.V., Shakhovskaya I.N. Microbiological characteristics of biotopes of the reproductive tract in endometritis. *Togliatti Medical Council*. 2021;1(2):38-44. (In Russ.) eLIBRARY ID: 20808469
5. Hashimoto T, Kyono K. Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients? *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(12):2471-2479. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01630-7>
6. Булгакова В.П., Боровиков И.О. Применение препаратов микронизированного натурального прогестерона при подготовке к проведению вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с маточным фактором бесплодия. *Проблемы репродукции*. 2018;24(6):6775. Bulgakova V.P., Borovikov I.O. Use of micronized natural progesterone as preparation for assisted reproductive technologies in patients with uterine infertility factor. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2018;24(6):6775. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/repro20182406167>
7. O'Callaghan JL, Turner R, Dekker Nitert M, Barrett HL, Clifton V, Pelzer ES. Re-assessing microbiomes in the low-biomass reproductive niche. *BJOG*. 2020;127(2):147-158. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15974>
8. Altmäe S, Rienzi L. Endometrial microbiome: new hope, or hype? *Reprod Biomed Online*. 2021;42(6):1051-1052. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.05.001>
9. Molina NM, Sola-Leyva A, Haahr T, Aghajanova L, Laudanski P, et al. Analysing endometrial microbiome: methodological considerations and recommendations for good practice. *Hum Reprod*. 2021;36(4):859-879. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab009>
10. Кисель Е.И. Современные возможности оценки состояния эндометрия при хроническом эндометрите (обзор литературы). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(4):698-702. Kisel E.I. The modern possibilities for assessment of the status of endometrium in chronic endometritis (literature review). *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(4):698-702. (In Russ.) eLIBRARY ID: 25779224
11. Al-Nasiry S, Ambrosino E, Schlaepfer M, Morré SA, Wieten L, et al. The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction. *Front Immunol*. 2020;11:378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00378>
12. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(6):684-703. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>
13. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):330-9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
14. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*. 2017;8(1):875. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>
15. Munro MG, Critchley HO, Broder MS, Fraser IS; FIGO Working Group on Menstrual Disorders. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011;113(1):3-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2010.11.011>
16. Блесманович А.Е., Алехина А.Г., Петров Ю.А. Хронический эндометрит и репродуктивное здоровье женщины. *Главный врач Юга России*. 2019;2(66):46-51. Blesmanovich A.E., Alyokhina A.G., Petrov Yu.A. Chronic endometritis and reproductive health of woman. *Chief Physician of the South of Russia*. 2019;2(66):46-51. (In Russ.) eLIBRARY ID: 38525134
17. Cardellicchio L, Reschini M, Paffoni A, Guarneri C, Restelli L, et al. Frozen-thawed blastocyst transfer in natural cycle: feasibility in everyday clinical practice. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(6):1509-1514. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4383-z>
18. Benaglia L, Busnelli A, Biancardi R, Vegetti W, Reschini M, et al. Oocyte retrieval difficulties in women with ovarian endometriomas. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(1):77-84. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.03.020>
19. Heravi FS, Zakrzewski M, Vickery K, Hu H. Host DNA depletion efficiency of microbiome DNA enrichment methods in infected tissue samples. *J Microbiol Methods*. 2020;170:105856. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105856>
20. Маринкин И.О., Трунченко Н.В., Волчек А.В., Агеева Т.А., Никитенко Е.В. и др. Маркеры воспаления в нормальном и тонком эндометрии при хроническом эндометрите. *Акушерство и гинекология*. 2018;2:65-73. Marinkin I.O., Trunchenko N.V., Volchek A.V., Ageeva T.A., Nikitenko E.V., et al. Inflammatory markers in the normal and thin endometrium in chronic endometritis. *Obstetrics and Gynecology*. 2018;2:65-73. (In Russ.) <https://doi.org/10.18565/aig.2018.2.65-73>
21. Liu Y, Ko EY, Wong KK, Chen X, Cheung WC, et al. Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. *Fertil Steril*. 2019;112(4):707-717.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.015>
22. Carosso A, Revelli A, Gennarelli G, Canosa S, Cosma S, et al. Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: a pilot study. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(9):2315-2326. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01878-4>
23. Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui

- R, Vankeirsbilck N, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ*. 2016;4:e1602. <https://doi.org/10.7717/peerj.1602>
24. Qiu T, Liu L, Zhou H, Sheng H, He Y, et al. Analysis of endometrial microbiota in intrauterine adhesion by high-throughput sequencing. *Ann Transl Med*. 2021;9(3):195. Erratum in: *Ann Transl Med*. 2021;9(14):1216. PMID: 33708822; PMCID: PMC7940878. <https://doi.org/10.21037/atm-20-2813>.
25. 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(1):129-36. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
26. Tao X, Franasiak JM, Zhan Y, Scott III RR, Rajchel J, et al. Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: Next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene. *Human Microbiome Journal*. 2017;3:15-21. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2017.01.004>

Информация об авторах

Ирина Игоревна Куценко, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; luzum69@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0938-8286>.

Игорь Олегович Боровиков, д.м.н., доцент, доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; bio2302@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8576-1359>

Елена Иосифовна Кравцова, к.м.н., доцент, доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8987-7375>

Вера Павловна Булгакова, аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; bvp1082@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8388-8644>.

Ольга Игоревна Боровикова, аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; borovikovaio@oxy-center.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7275-9388>

Рушана Вадимовна Черемных, аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; rushana.tcheremnih@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8008-5280>

Анастасия Александровна Андреева, аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; nastyagorbulina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5749-4193>

Максим Игоревич Боровиков, студент, Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия; agyaxgy@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2543-6348>

Вклад авторов

И.И. Куценко — разработка концепции и дизайна исследования разработка (формирование идеи; формулировка и развитие ключевых целей и задач), проведение исследования (анализ и интерпретация полученных данных); подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи (принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и ее окончательный вариант);

Information about the authors

Irina I. Kutsenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; luzum69@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0938-8286>.

Igor O. Borovikov, Dr. Sci. (Med.), As. Prof. of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; bio2302@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8576-1359>

Elena I. Kravtsova, PhD (Med.), Assoc. Prof., Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8987-7375>

Vera P. Bulgakova, graduate student of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology at the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; bvp1082@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8388-8644>.

Olga I. Borovikova, graduate student of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology at the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; borovikovaio@oxy-center.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7275-9388>

Rushana V. Cheremnykh, graduate student of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology at the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; rushana.tcheremnih@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8008-5280>

Anastasia A. Andreeva, graduate student of the Chair of Obstetrics, Gynecology and Perinatology at the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia; nastyagorbulina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5749-4193>

Maksim I. Borovikov, student of the Kuban State Technological University, Krasnodar, Russia; agyaxgy@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2543-6348>

Author's contribution:

Irina I. Kutsenko — research of the concept and design development (formation of the idea; formulation and development of key goals and objectives), conducting research (analysis and interpretation of the data obtained), approval of the final version of the article (taking responsibility for all aspects of the work, the integrity of all parts of the article and its final version);

Igor O. Borovikov — development of the concept and design of the study, obtaining and analyzing data, reviewing

И.О. Боровиков — разработка концепции и дизайна исследования, получение и анализ данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи окончательное утверждение версии для публикации;

Е.И. Кравцова — получение и анализ данных, визуализация (подготовка, создание опубликованной работы в части визуализации и отображении данных), ресурсное обеспечение исследования;

В.П. Булгакова — получение и анализ данных, визуализация (подготовка, создание опубликованной работы в части визуализации и отображении данных);

О.И. Боровикова — получение и анализ данных, проведение статистического анализа;

Р.В. Черемных — обзор публикаций по теме статьи, проведение статистического анализа;

А.А. Андреева — получение и анализ данных, проведение статистического анализа;

М.И. Боровиков — создание 3D-модели, разработка инженерной документации двухпросветного зонда.

publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript final approval of the version for publication;

Elena I. Kravtsova — data acquisition and analysis, visualization (preparation, creation of published work in terms of visualization and display of data), statistical analysis, resource support of the study;

Vera P. Bulgakova — data acquisition and analysis, visualization (preparation, creation of published work in terms of visualization and display of data);

Olga I. Borovikova — data acquisition and analysis, visualization, statistical analysis;

Rushana V. Cheremnykh — review of publications on the topic of the article, statistical analysis;

Anastasia A. Andreeva — data acquisition and analysis, visualization, statistical analysis;

Maksim I. Borovikov — creation of a 3D model, development of engineering documentation of a two-lumen probe.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declares no conflict of interest.

Поступила в редакцию / *Received*: 02.03.2023

Доработана после рецензирования / *Revised*: 07.03.2023

Принята к публикации / *Accepted*: 23.03.2023