

Особенности состава кишечной микробиоты у пациенток с наружным генитальным эндометриозом

В.А.Пронина¹, А.Б.Гордеев¹, В.В.Муравьева¹, А.В.Скоробогатый¹, К.Н.Жигалова¹,
П.А.Денисов¹, Г.Е.Чернуха¹, Т.В.Припутневич^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Эндометриоз является распространенным гормонозависимым заболеванием, ассоциированным с хроническим воспалением, этиология и патогенез которого являются предметом научных дискуссий. По результатам современных исследований, существует взаимосвязь между составом кишечной микробиоты (КМ) и эндометриозом, включая его отдельные формы.

Цель исследования – провести анализ состава КМ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ). Проведено одномоментное исследование КМ у 56 пациенток с НГЭ и 35 условно здоровых женщин, сопоставимых по возрасту. Образцы фекалий исследованы методом культуромики с посевом на расширенный спектр питательных сред и последующей видовой идентификации всех выделенных микроорганизмов с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). По результатам исследования КМ пациенток с НГЭ оказалась представлена меньшим видовым и таксономическим разнообразием, увеличением индекса *Bacillota/Bacteroidota* за счет повышения абсолютного и относительного числа факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. и облигатно-анаэробных УПМ *Clostridium* spp. и снижения количества комменсальных бактерий *Weissella* spp., обладающих противовоспалительным и пробиотическим потенциалом, а также дисбаланса бактериоидов. Кроме того, отмечалось повышение частоты встречаемости и титра грамотрицательных УПМ *Citrobacter* spp., обладающих провоспалительным потенциалом за счет эндотоксина бактериальной стенки. Таким образом, КМ пациенток с НГЭ характеризуется снижением видового богатства, увеличением числа УПМ на фоне снижения бактерий-симбионтов.

Ключевые слова: эндометриоз, кишечная микробиота, культуромика, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Для цитирования: Пронина В.А., Гордеев А.Б., Муравьева В.В., Скоробогатый А.В., Жигалова К.Н., Денисов П.А., Чернуха Г.Е., Припутневич Т.В. Особенности состава кишечной микробиоты у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Бактериология. 2024; 9(3): 20–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-20-27

Features of the intestinal microbiota composition in patients with external genital endometriosis

V.A.Pronina¹, A.B.Gordeev¹, V.V.Muravieva¹, A.V.Skorobogatiy¹, K.N.Zhigalova¹,
P.A.Denisov¹, G.E.Chernukha¹, T.V.Priputnevich^{1,2}

¹V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia Federation

Endometriosis is a common hormone-dependent disease associated with chronic inflammation, the etiology and pathogenesis of which are the subject of scientific debate. According to the results of modern research, there is a relationship between the composition of the intestinal microbiota (IM) and endometriosis, including its individual forms.

The aim of the study was to analyze the composition of IM in patients with external genital endometriosis. A single-stage study of IM was conducted in 56 patients with endometriosis and 35 conditionally healthy women of comparable age. Faecal samples

Для корреспонденции:

Пронина Вероника Алексеевна, врач акушер-гинеколог, аспирант
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4
Статья поступила 02.04.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Veronika A. Pronina, obstetrician-gynecologist, PhD student of the V.I.Kulakov
National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 4 Academician Oparin str., Moscow, 117997, Russian Federation
The article was received 02.04.2024, accepted for publication 30.09.2024

were examined by culturomics with inoculation on an extended range of nutrient media and subsequent species identification of all isolated microorganisms using time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). According to the results of the study, the IM of endometriosis patients was represented by a lower species and taxonomic diversity, an increase in the *Bacillota/Bacteroidota* index due to an increase in the absolute and relative number of facultative anaerobic opportunistic pathogens *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. and obligate-anaerobic *Clostridium* spp., and a decrease in the number of commensal bacteria *Weissella* spp., which have anti-inflammatory and probiotic potential, as well as an imbalance of bacteroids. In addition, there was an increase in the frequency of occurrence and titer of gram-negative *Citrobacter* spp., which have proinflammatory potential due to bacterial wall endotoxin. Thus, the IM of patients with endometriosis is characterized by a decrease in species richness, an increase in the number of opportunistic pathogens against the background of a decrease in symbiont bacteria.

Key words: endometriosis, gut microbiota, culturomics, MALDI-TOF mass spectrometry

For citation: Pronina V.A., Gordeev A.B., Muravieva V.V., Skorobogaty A.V., Zhigalova K.N., Denisov P.A., Chernukha G.E., Pripitnevich T.V. Features of the intestinal microbiota composition in patients with external genital endometriosis. *Bacteriology*. 2024; 9(3): 20–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-20-27

Эндометриоз является гормонозависимым заболеванием, ассоциированным с хроническим воспалением, частота встречаемости которого может достигать 18% среди женщин репродуктивного возраста [1]. Несмотря на широкую распространенность заболевания, отмечается задержка в постановке диагноза, составляющая в среднем от 6 до 10 лет [2]. Это указывает на значимость совершенствования методов диагностики эндометриоза, в т.ч. неинвазивных.

Этиология и патогенез эндометриоза остаются предметом научных дискуссий, несмотря на существование более 10 теорий его возникновения. Японские исследователи K.N.Khan et al. выдвинули гипотезу бактериального заражения, концепция которой выстроена на влиянии контаминации менструальной крови *Escherichia coli*. Ими было показано, что бактериальный эндотоксин липополисахарид (ЛПС), воздействуя опосредованно через Toll-подобные рецепторы 4-го типа, может стимулировать выработку провоспалительных цитокинов и факторов роста, тем самым способствуя развитию хронического воспаления [3]. Считается, что в патогенез эндометриоза вносит вклад эстроболом. Показано, что ряд микроорганизмов, включая *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia* spp., могут секретировать β-глюкуронидазу – фермент, способствующий деконъюгированию эстрогенов в просвете кишечника в активные формы, что создает локальную эндогенную гиперэстрогению [4, 5].

Ввиду потенциального вклада микробиоты в генез эндометриоза, а также необходимости в усовершенствовании неинвазивной диагностики заболевания ряд исследователей сделали попытку выявить значимые изменения микробного состава, характерные для эндометриоза. Однако данные литературы неоднозначны не только по полученным результатам, но также по выборке пациенток и области исследования [6–11]. Тем не менее в настоящее время изучается возможность использования информации о составе микробиоты для диагностики и терапии многих заболеваний, в т.ч. путем проведения микробиологического исследования образцов фекалий пациентов методом культуromики [12, 13]. Данные литературы свидетельствуют о том, что при эндометриозе отмечается изменение соотношения ряда микробных сообществ [6–11]. Несмотря на достаточное количество работ по изучению взаимосвязи состава микробиоты и эндометриоза, лишь единичные исследования проведены на кишечной микробиоте (КМ) человека [11]. Важно отметить, что анализ отделяемого желудочно-кишечного

тракта (ЖКТ) является одним из наиболее простых и удобных методов с точки зрения сбора материала, а диагностическая значимость образцов фекалий сопоставима с другими исследуемыми биологическими средами [14]. Изучение КМ также является обоснованным, поскольку до 85% пациенток с эндометриозом имеют различные желудочно-кишечные симптомы [15].

Таким образом, целью настоящего исследования являлось проведение анализа состава КМ у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ).

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное исследование на базе Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России в период с декабря 2021 г. по декабрь 2023 г. Основную группу составили 56 пациенток с НГЭ (средний возраст 29 (25; 36) лет, средний индекс массы тела (ИМТ) 20,05 (18,45; 21,55) кг/м²), в группу сравнения включены 35 условно здоровых пациенток (средний возраст 27 (26; 28,75) лет, средний ИМТ 21,9 (19,73; 24,13) кг/м²). Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и ИМТ (> 0,05). Критерий включения в основную группу: наличие признаков НГЭ по данным магнитно-резонансной томографии органов малого таза. Критерий включения в группу сравнения: отсутствие признаков генитального эндометриоза по данным экспертного ультразвукового исследования органов малого таза. Дополнительные критерии включения пациенток обеих групп: возраст от 18 до 45 лет; наличие информированного согласия на участие в исследовании, одобренном этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России. Критерии невключения пациенток обеих групп: невозможность сбора образцов фекалий для микробиологического исследования утром в день проводимого исследования; наличие симптомов со стороны ЖКТ, которые могли бы помешать сбору материала; менструация; прием антибактериальных или пробиотических препаратов, гормонотерапия как минимум за 3 мес. до включения в исследование. Критерии исключения для обеих групп: наличие тяжелой соматической патологии; наличие онкологических заболеваний на момент включения в исследование или в анамнезе; органические заболевания ЖКТ на момент включения в исследование или в анамнезе.

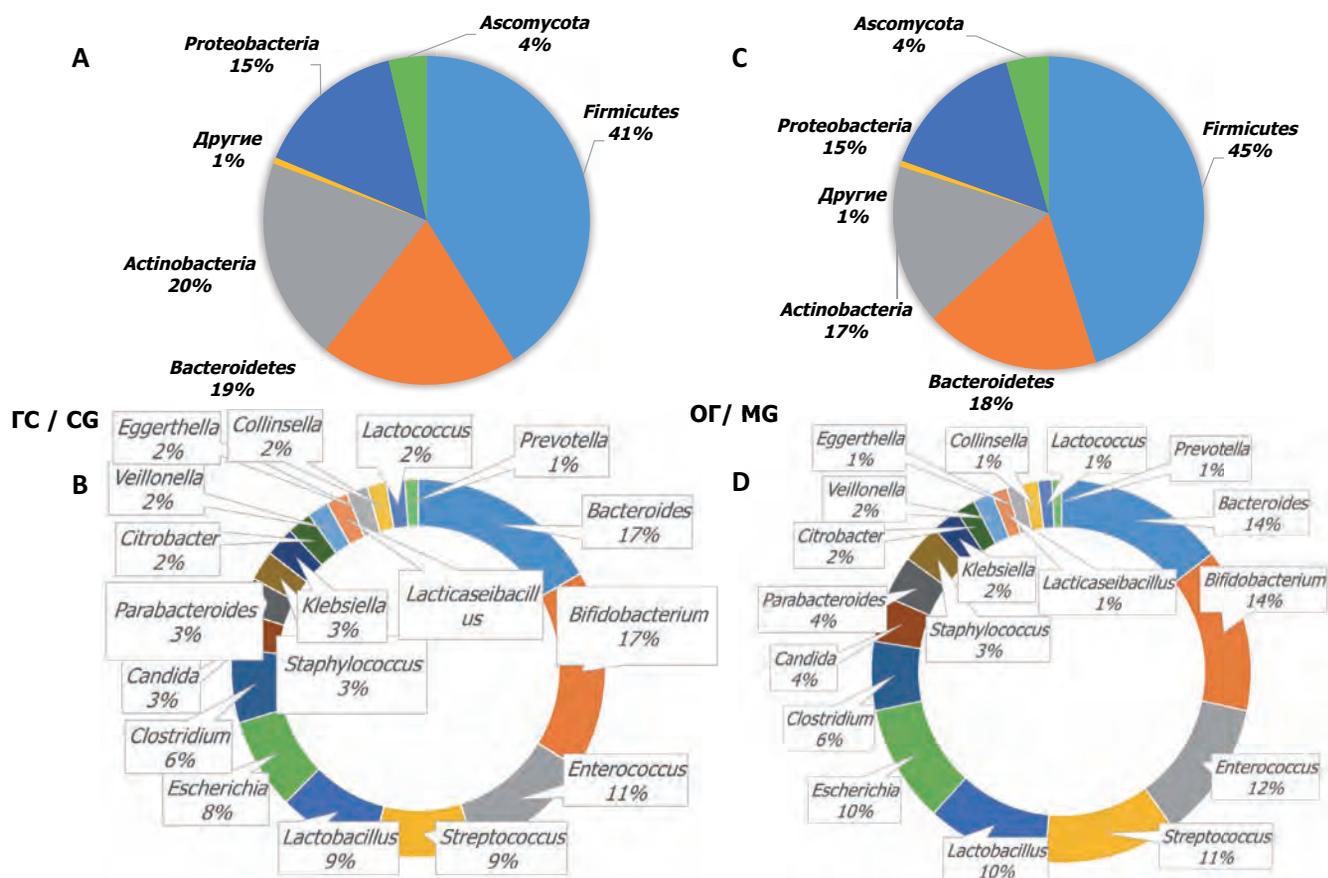


Рис. 1. Изменение состава кишечной микробиоты по типам и родам у пациенток основной группы (С, D) и группы сравнения (А, В). ГС – группа сравнения, ОГ – основная группа.
 Fig. 1. Changes in the composition of the intestinal microbiota by type and gender in patients of the main group (C, D) and the comparison group (A, B). CG – comparison group, MG – main group.

Методы исследования

В ходе работы выполнено микробиологическое исследование просветной микробиоты ЖКТ методом культуромики с использованием расширенного спектра универсальных, селективных и дифференциально-диагностических питательных сред. Пробы фекалий собирали в стерильный контейнер без консерванта и доставляли в лабораторию в течение 3 ч. Для оценки видового и количественного состава (в пересчете на 1 г биоматериала) готовили десятикратные серийные разведения фекалий в физиологическом растворе с последующим посевом на питательные среды.

Для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов использовали: колумбийский кровяной агар, хромогенную среду *Brilliance*, сальмонелла-шигелла агар, декстрозный агар, среду для выявления и дифференциации *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar; Франция), маннит-солевой агар (Himedia; Индия), энтерококковый агар, агар Эндо (ФГУН «ГНЦ ПМБ»; Россия), для грибов – агар Сабуро (Oxoid; Великобритания). Засеянные чашки Петри помещали в термостат (37°C и для грибов дополнительно – 30°C). Микроаэрофилы выращивали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при 37°C: лактобациллы – на лактобакагаре (ФГУН «ГНЦ ПМБ»; Россия), кампилобактер – на среде для выделения кампилобактера. облигатные анаэробы культивировали на предварительно редуцированных средах: агаре Шедлера с необходимыми добавками, основ-

ном агаре для анаэробов, железосульфитном агаре, перфрингенс-агаре, селективном агаре для *Clostridium difficile* (Oxoid; Великобритания); агаре для бифидобактерий (Himedia; Индия) в условиях анаэробного бокса (Whitley DG 250 Anaerobic Workstation, Великобритания) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N₂ – 80%; CO₂ – 10%; H₂ – 10%) в течение 3–4 суток. Видовую идентификацию проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре MicroFlex, с программным обеспечением MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия), версия 5.0. Микроорганизм считали идентифицированным до вида с высокой степенью вероятности при значениях SCORE ≥ 2,0.

Статистический анализ

Размер выборки определялся сопоставимым с представленными в исследованиях других авторов [6–11]. Для статистической обработки данных использовались программы IBM SPSS Statistics (v.26) и MedCalc statistical software (версия 20.104–64-bit). Для количественных показателей были рассчитаны: среднее значение (*M*), среднеквадратическое отклонение (*SD*), медиана (*Me*), интерквартильный интервал (*Q1*; *Q3*), для качественных и порядковых показателей – частоты (%). Все количественные параметры были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Параметры, имеющие распреде-

ление, отличное от нормального, представлены в формате *Me* (Q1; Q3). Для нахождения различий между группами применяли критерий Манна–Уитни (для количественных показателей) и χ^2 (для категориальных показателей). Расчет видового богатства проводился с использованием индексов Маргалефа, Менхиника, а также индексов Симпсона, Шеннона для выявления изменения таксономического разнообразия (альфа-разнообразия). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В основной группе и группе сравнения выделены 656 и 477 штаммов микроорганизмов соответственно, принадлежавших к пяти типам микроорганизмов: *Bacillota* (ранее *Firmicutes*), *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*), *Actinomycetota* (ранее *Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*) и *Ascomycota*. Микробное разнообразие было представлено 12 классами, 20 порядками, 38 семействами, 51 родом и 163 видами микроорганизмов, что проиллюстрировано на рис. 1.

Превалирующими типами микроорганизмов в основной группе и группе сравнения были *Bacillota* (45,27 и 41,39%) и *Bacteroidota* (18,29 и 19,71% соответственно). Показано, что у пациенток с НГЭ отмечался значимо больший индекс *Bacillota/Bacteroidota* (рис. 2).

Для пациенток с НГЭ также характерно значимо меньшее как видовое, так и таксономическое разнообразие микроорганизмов при отсутствии разницы в их абсолютном количестве (титр КОЕ/г, $p > 0,05$) (рис. 3).

Статистически значимые отличия по количественным показателям и частоте выявляемости отдельных родов и видов микроорганизмов представлены в табл. 1, 2.

При детальном анализе состава КМ установлено, что среди грамотрицательной факультативно-анаэробной ми-

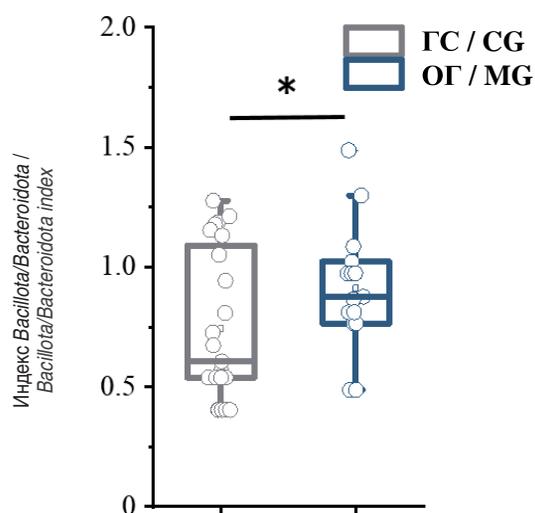


Рис. 2. Индекс *Bacillota/Bacteroidota* у пациенток основной группы и группы сравнения. ГС – группа сравнения, ОГ – основная группа; Манна–Уитни тест, * $p = 0,04806$.
 Fig. 2. The *Bacillota/Bacteroidota* index in patients of the main group and the comparison group. CS – comparison group, MG – main group; Mann–Whitney test, * $p = 0,04806$.

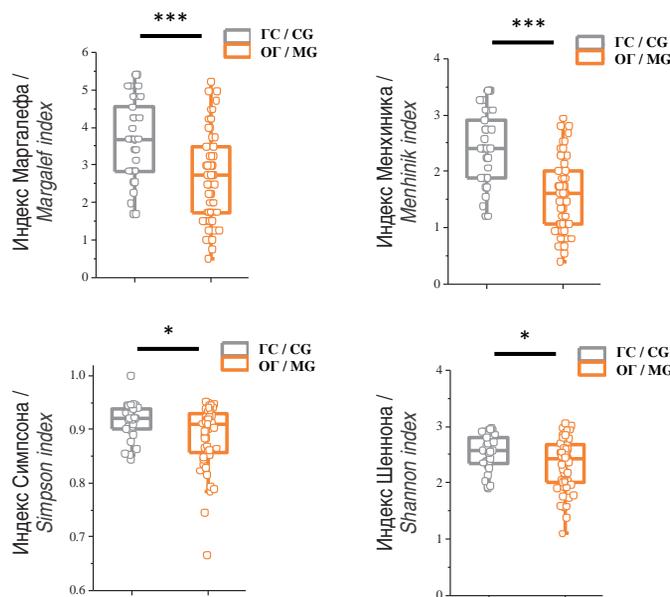


Рис. 3. Индексы видового богатства (Маргалефа, Менхиника) и альфа-разнообразия (Симпсона, Шеннона) кишечной микробиоты пациенток исследуемых групп. Манна–Уитни тест, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; ГС – группа сравнения, ОГ – основная группа.
 Fig. 3. Indices of species richness (Margalef, Menhinik) and alpha diversity (Simpson, Shannon) of the intestinal microbiota of the patients of the studied groups. Mann–Whitney test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; CS – comparison group, MG – main group.

крофлоры в обеих группах доминировала *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, преимущественно в умеренных и высоких титрах – 10^7 – 10^8 КОЕ/г, частота встречаемости в основной группе составила 53/56 (94,64%), в группе сравнения – 34/35 (97,14%). У пациенток с НГЭ в 4 раза чаще по отношению к группе сравнения высевалась лактозонегативная *E. coli* (7/56 (12,5%) и 1/35 (2,86%) соответственно), отмечался единичный случай гемолитической *E. coli*. Значительно реже встречались другие условно-патогенные энтеробактерии: *Citrobacter* spp. – у 9/56 (16,07%) и 4/35 (11,43%) пациенток, *Enterobacter* spp. – у 4/56 (7,14%) и 7/35 (20,0%), *Klebsiella* spp. – у 14/56 (25,0%) и 8/35 (22,86%) пациенток соответственно. Значимая разница отмечена для *Enterobacter cloacae*, частота выявляемости которого была в 9,5 раза ниже у пациенток с НГЭ, а также *C. freundii*, титр которого был в 1,5 раза выше при эндометриозе (табл. 1, 2).

Превалирующими представителями грамположительных факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) были *Streptococcus* spp., преимущественно *S. anginosus*, выявленные у каждой третьей пациентки с НГЭ, что было в 3 раза чаще, чем в группе сравнения. Бактерии *Enterococcus* spp. присутствовали в микробиоте 70% пациенток и были преимущественно представлены видами с нормальной ферментативной активностью – *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. galinarum* в умеренных титрах 10^6 – 10^7 КОЕ/г. Обращало на себя внимание, что у каждой седьмой пациентки с НГЭ выделяли *E. avium* (8/56, 14,9%), в то время как в группе сравнения он отсутствовал (табл. 2).

Стафилококки (6 видов у пациенток с НГЭ и 4 вида у женщин группы сравнения) чаще выделяли у пациенток с эндометриозом и в значимо большем титре в отличие от группы

Таблица 1. Титр микроорганизмов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом и группы сравнения
Table 1. The titre of microorganisms in patients with endometriosis and the comparison group

Микроорганизмы / Microorganisms	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г (медиана (ИКР)) / Number of microorganisms, lg CFU/g (Me (Q1; Q3))		p-value
	основная группа / main group	группа сравнения / comparison group	
<i>Bacteroides fragilis</i>	9,0 (8,0;10,0)	8,0 (8,0;8,0)	0,0289
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8,5 (7,0;10,0)	10,0 (10,0;10,0)	0,0046
<i>Bacteroides clarus</i>	9,5	8,0 (8,0;8,0)	0,0157
<i>Collinsella aerofaciens</i>	8,0 (8,0;10,0)	10,0 (10,0;10,0)	0,0321
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	9,5 (8,5;10,0)	8,0 (7,25;9,0)	0,0437
<i>Clostridium</i> spp.	7,0 (6,0;8,0)	6,0 (6,0;6,0)	0,0240
<i>Clostridium innocuum</i>	8,0 (7,0;8,0)	6,0 (6,0;7,0)	0,0035
<i>Citrobacter freundii</i>	6,0 (6,0;6,75)	4,0	0,0429
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,0 (5,0;6,0)	4,0 (4,0;4,5)	0,0097
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,0 (4,5;5,5)	4,0 (4,0;4,0)	0,0281
<i>Enterococcus</i> spp.	6,0 (6,0;7,0)	6,0 (6,0;8,0)	0,0371

Таблица 2. Частота встречаемости микроорганизмов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом и группы сравнения
Table 2. Incidence of microorganisms in patients with endometriosis and the comparison group

Микроорганизмы / Microorganisms	Частота встречаемости микроорганизмов (в % и абсолютное значение) / Occurrence frequency of microorganisms (in % and absolute value)		p-value
	основная группа / main group	группа сравнения / comparison group	
<i>Bacteroides ovatus</i>	16,07% (9/56)	37,14% (13/35)	0,023
<i>Parabacteroides merdae</i>	5,36% (3/56)	20,0% (7/35)	0,030
<i>Collinsella aerofaciens</i>	14,29% (8/56)	31,43% (11/35)	0,049
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1,79% (1/56)	14,29% (5/35)	0,02
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	14,29% (8/56)	40,0% (14/35)	0,006
<i>Weissella</i> spp.	3,57% (2/56)	17,14% (6/35)	0,027
<i>Weissella viridescens</i>	0	8,57% (3/35)	0,026
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,79% (1/56)	17,14% (6/35)	0,008
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	10,71% (6/56)	0	0,046
<i>Enterococcus avium</i>	14,29% (8/56)	0	0,020
<i>Streptococcus anginosus</i>	32,14% (18/56)	11,43% (4/35)	0,025

сравнения (6,0 (5,0; 6,0) КОЕ/г и 4,0 (4,0; 4,5) КОЕ/г соответственно). Обращает на себя внимание более высокий уровень колонизации ЖКТ (5,0 (4,5; 5,5) КОЕ/г) *S. aureus* у пациенток с НГЭ (табл. 1).

Облигатно-анаэробная часть КМ преимущественно представлена семейством *Bacteroidaceae*. В группе сравнения в 2 раза чаще встречались *B. ovatus*, а также отмечен более высокий уровень колонизации *B. vulgatus*. При этом для па-

циенток с НГЭ были характерны более высокие титры *B. clarus* и *B. fragilis*. Среди *Parabacteroides* spp. интерес представляет вид *P. merdae*, встречающийся в 4 раза чаще в группе сравнения (табл. 1, 2). Также отмечалось уменьшение частоты обнаружения *Prevotella copri* (порядок *Bacteroidales*) у пациенток с НГЭ в отличие от группы сравнения (5/56 (8,93%) и 5/35 (14,3%) соответственно), однако результаты не достигли статистической значимости.

Clostridium spp. выделяли практически у каждой второй пациентки с НГЭ (25/56, 44,64%) и в значимо больших титрах в сравнении с условно здоровыми женщинами (7,0 (6,0; 8,0) КОЕ/г и 6,0 (6,0; 6,0) КОЕ/г соответственно). Наиболее высокие количественные показатели отмечены для вида *C. innocuum*.

Среди прочих облигатно-анаэробных УПМ внимания заслуживает *C. aerofaciens* (семейство *Coriobacteriaceae*), которую в 2 раза чаще, в отличие от пациенток с НГЭ, выявляли в группе сравнения (11/35 (31,43%) и 8/56 (14,29%) соответственно) в высоком титре – 10^{10} КОЕ/г.

Значительную часть КМ составили микроорганизмы из группы симбионтов – *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.

Лактобациллы выделяли в группе сравнения практически в 2 раза чаще, чем в основной группе (7/35 (20%) и 7/56 (12,5%) соответственно), преимущественно *L. paracasei* (10/56 (17,86%), *L. rhamnosus* (8/56 (14,29%), *L. gasseri* (7/56 (12,5%), *L. salivarius* (7/56 (12,5%) и *L. crispatus* (5/56 (8,93%) в умеренных (10^4 – 10^7 КОЕ/г) и высоких (10^8 – 10^{11} КОЕ/г) титрах. В группе сравнения в 5 раз чаще высевали *Weissella* spp. (молочнокислые бактерии, также представляющие семейство *Lactobacillaceae*) – 6/35 (17,14%) и 2/56 (3,57%) соответственно.

Бифидобактерии встречались значительно чаще, чем лактобациллы, и обнаружены у 52/56 (92,86%) пациенток с НГЭ и 35/35 (100%) женщин группы сравнения, преимущественно в умеренных и высоких титрах – 10^7 – 10^{10} КОЕ/г. У пациенток с НГЭ превалировали три вида: *B. longum* (39/56 (69,64%), *B. adolescentis* (14/56 (25,0%) и *B. bifidum* (12/56 (21,43%). При этом у пациенток с НГЭ, в отличие от группы сравнения, в 3 раза реже высевали *B. pseudocatenulatum* (14,29 и 40,0%) и в 8 раз – *B. catenulatum* (1,79 и 14,29% соответственно) (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали дисбаланс состава КМ у пациенток с НГЭ, что проявлялось снижением таксономического и видового разнообразия, увеличением индекса *Bacillota/Bacteroidota*, снижением комменсальных бактерий *Collinsella* spp. и *Bifidobacterium* spp. и увеличением УПМ типа *Pseudomonadota* (рис. 4).

В ходе проведенного исследования были установлены изменения соотношения ряда микробных сообществ, что согласуется с рядом ранее проведенных исследований. Так, в работе A.Swensson et al. продемонстрировано снижение альфа- и бета-разнообразия КМ у пациенток с эндометриозом [7]. Однако наибольший интерес представляет соотношение *Bacillota/Bacteroidota*, которое является значимым показателем при оценке микробного состава и тесно связано с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Увеличение данного индекса может быть связано с повышением количества УПМ типа *Bacillota*, которые способны продуцировать ряд внеклеточных протеаз и других метаболитов

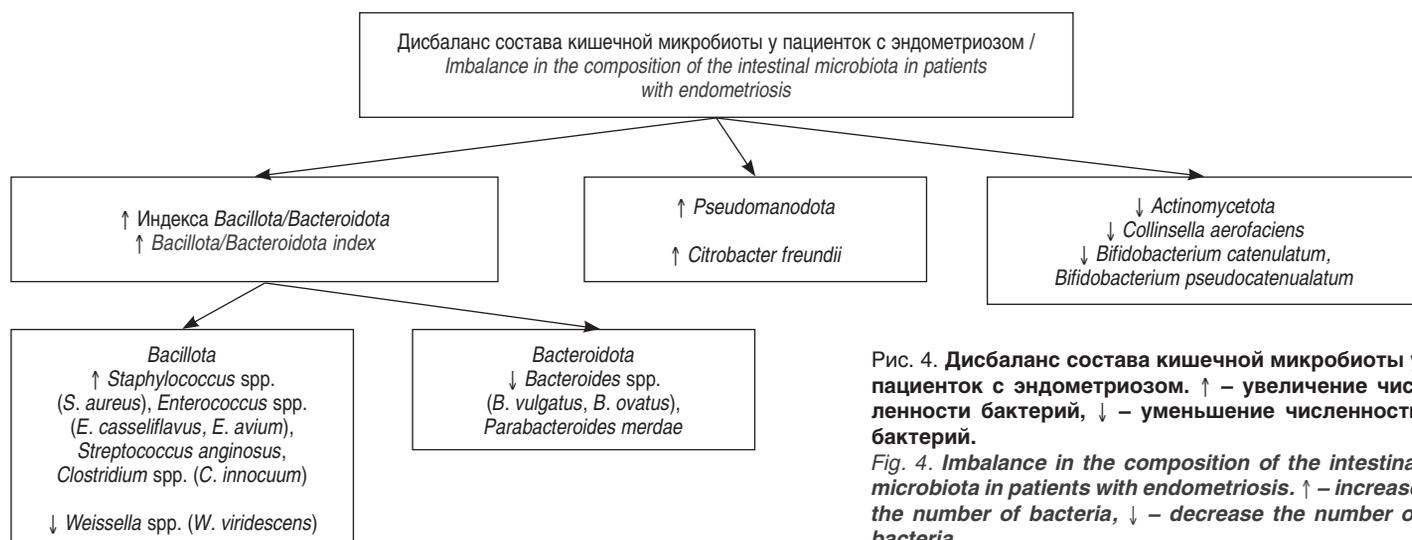


Рис. 4. Дисбаланс состава кишечной микробиоты у пациенток с эндометриозом. ↑ – увеличение численности бактерий, ↓ – уменьшение численности бактерий.

Fig. 4. Imbalance in the composition of the intestinal microbiota in patients with endometriosis. ↑ – increase the number of bacteria, ↓ – decrease the number of bacteria.

(гистамин, триптазы и др.), провоцирующих аномальные нейрореакции и впоследствии приводящих к развитию СРК [16]. Учитывая, что наличие СРК увеличивает шансы на последующую верификацию эндометриоза более чем в 3 раза, такие изменения состава КМ являются значимыми [17]. Кроме того, отмечалось снижение частоты выявления комменсальных бактерий *Weissella* spp. (тип *Bacillota*). По данным литературы, ряд микроорганизмов рода *Weissella* обладают пробиотическим потенциалом за счет продукции декстрана, что способствует улучшению метаболизма и функции ЖКТ, а также стимулирует рост других комменсальных микроорганизмов, главным образом *Bifidobacterium* spp. [18]. Кроме того, бактерии *Weissella* spp. способны колонизировать стенку кишечника, создавая муциновую защитную пленку, и обладают антимикробным потенциалом в отношении *S. aureus* и других УПМ [19]. Таким образом, уменьшение числа бактерий рода *Weissella* у пациенток с НГЭ может приводить к снижению защитных функций кишечного барьера и потенциально способствовать формированию других изменений состава КМ в виде увеличения популяции УПМ и снижения бактерий-комменсалов типа *Actinomycetota*.

На увеличение индекса *Bacillota/Bacteroidota* у пациенток с НГЭ также влияло снижение количества симбионтных бактерий типа *Bacteroidota* – *Bacteroides* spp. и *Parabacteroides* spp. В нашем исследовании у пациенток с НГЭ наблюдалось снижение частоты выделения бактерий порядка *Bacteroidales*: *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *P. merdae*; снижение численности *B. vulgatus*. В то же время отмечен более высокий уровень колонизации ЖКТ *B. clarus* и *B. fragilis*.

Бактероиды являются важной составляющей микробиоты кишечника человека, выступая в роли бактерий-комменсалов. Так, вид *B. ovatus* обладает пробиотическим потенциалом, участвует в синтезе активных метаболитов – «полезных» короткоцепочечных жирных кислот – ацетата, пропионата и бутирата, имеющих противовоспалительный и иммуномодулирующий потенциал, а также поддерживающих целостность кишечного барьера [20, 21]. *B. vulgatus* также является значимой частью кишечного гомеостаза, участвует в метаболизме гликанов кишечной слизи как напрямую, так и опосредованно за счет увеличения колонизации труднокультивируемого комменсала *Akkermansia muciniphila* [22].

По данным литературы, *B. clarus* и энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis* показали себя как бактерии-кандидаты раннего скрининга колоректального рака [23]. Кроме того, известно, что ряд представителей семейства *Bacteroidaceae*, в т.ч. выявленных в нашем исследовании, являются частью эстроболома, ввиду чего можно предполагать их вклад в формирование эндогенной гиперэстрогении, способствующей развитию и прогрессированию НГЭ [24]. Таким образом, можно полагать, что у пациенток с НГЭ значимо не только снижение числа отдельных бактериоидов, что способствует дисбалансу кишечного гомеостаза, но также их соотношение и влияние на рост других комменсальных микроорганизмов, что требует подтверждения в будущих исследованиях.

По результатам проведенного исследования при НГЭ выявлено значимое увеличение частоты встречаемости и титра бактерий рода *Citrobacter* (тип *Pseudomonadota*) и, в частности, *C. freundii* – УПМ, который может присутствовать в составе нормофлоры ЖКТ, но в низких концентрациях. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными факультативно-анаэробными микроорганизмами, имеющими в составе клеточной стенки ЛПС, что может играть роль в развитии воспалительного иммунного ответа [25]. Несмотря на относительно низкую вирулентность, *Citrobacter* spp. и *C. freundii* в частности могут способствовать развитию гнойно-септических осложнений, доля которых в структуре грамотрицательных инфекций составляет до 0,8% [26]. Кроме того, в работе Q.Lin et al, где проводилась оценка микробиоты эндометрия, *C. freundii* была определена как одна из бактерий-кандидатов, ассоциированных с аденомиозом [27].

Изучение состава КМ представляет интерес с точки зрения поиска новых методов терапии эндометриоза. В экспериментальных исследованиях отмечена некоторая польза приема пробиотиков на основе штаммов *L. gasseri* для подавления роста эндометриоидных гетеротопий. Предполагаемый патогенетический механизм заключается в иммуностимулирующей активности посредством активации естественных киллеров [28, 29]. S.B.Chadchan et al. показали, что при введении мышам с эндометриозом антибиотиков широкого спектра действия отмечалось уменьшение размеров эндометриоидных очагов примерно в 5 раз со значимым

снижением концентрации провоспалительных факторов в перитонеальной жидкости. При этом пероральная трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) от мышей-реципиентов с эндометриозом способствовала возобновлению роста эктопических очагов у мышей, получавших метронидазол [30]. Результаты являются многообещающими, поскольку ТФМ в перспективе может позволить закрыть нишу консервативной терапии у пациенток, рефрактерных к «классическим» медикаментозным схемам, или в сложных случаях – при многократных рецидивах заболевания или распространенном НГЭ.

Заключение

Таким образом, у пациенток с НГЭ наблюдался дисбаланс состава КМ, который проявлялся снижением таксономического и видового разнообразия, а также изменением соотношения ряда микробных сообществ.

Установлено увеличение индекса *Bacillota/Bacteroidota* за счет увеличения доли факультативно-анаэробных (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp.) и облигатно-анаэробных (*Clostridium* spp.) УПМ (тип *Bacillota*) и снижения доли микроорганизмов типа *Bacteroidota* (*Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp.) на фоне уменьшения популяции комменсальных микроорганизмов (*Weissella* spp., *Collinsella* spp. и *Bifidobacterium* spp.), что может способствовать снижению защитных функций кишечного барьера и снижению колонизации ЖКТ другими комменсальными микроорганизмами.

Кроме того, отмечалось повышение частоты встречаемости и генерации грамотрицательных УПМ типа *Pseudomonadota* – *Citrobacter* spp., обладающих провоспалительным потенциалом за счет ЛПС бактериальной стенки.

Полученные сведения о возможном участии КМ в патогенезе НГЭ свидетельствуют о необходимости продолжения поиска значимых маркерных микроорганизмов НГЭ и его отдельных форм, что в перспективе может позволить усовершенствовать неинвазивную диагностику и терапию заболевания.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Funding information

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациента.

Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from the patient.

Литература / References

- Moradi Y, Shams-Beyranvand M, Khateri S, Gharahjeh S, Tehrani S, Varse F, et al. A systematic review on the prevalence of endometriosis in women. *Indian J Med Res.* 2021 Mar;154(3):446-454. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_817_18
- Agarwal SK, Antunez-Flores O, Foster WG, Hermes A, Golshan S, Soliman AM, et al. Real-world characteristics of women with endometriosis-related pain entering a multidisciplinary endometriosis program. *BMC Womens Health.* 2021 Jan 7;21(1):19. DOI: 10.1186/s12905-020-01139-7
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, et al. *Escherichia coli* contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2860-3.e1-3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.053
- Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe.* 2011 Oct 20;10(4):324-35. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.003
- Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor-Positive Female Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Apr 22;108(8):djw029. DOI: 10.1093/jnci/djw029
- Ata B, Yildiz S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A, et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Sci Rep.* 2019 Feb 18;9(1):2204. DOI: 10.1038/s41598-019-39700-6
- Svensson A, Brunkwall L, Roth B, Orho-Melander M, Ohlsson B. Associations Between Endometriosis and Gut Microbiota. *Reprod Sci.* 2021 Aug;28(8):2367-2377. DOI: 10.1007/s43032-021-00506-5
- Shan J, Ni Z, Cheng W, Zhou L, Zhai D, Sun S, et al. Gut microbiota imbalance and its correlations with hormone and inflammatory factors in patients with stage 3/4 endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2021 Nov;304(5):1363-1373. DOI: 10.1007/s00404-021-06057-z
- Perrotta AR, Borrelli GM, Martins CO, Kallas EG, Sanabani SS, Griffith LG, et al. The Vaginal Microbiome as a Tool to Predict rASRM Stage of Disease in Endometriosis: a Pilot Study. *Reprod Sci.* 2020 Apr;27(4):1064-1073. DOI: 10.1007/s43032-019-00113-5
- Chang CY, Chiang AJ, Lai MT, Yan MJ, Tseng CC, Lo LC, et al. A More Diverse Cervical Microbiome Associates with Better Clinical Outcomes in Patients with Endometriosis: A Pilot Study. *Biomedicines.* 2022 Jan 14;10(1):174. DOI: 10.3390/biomedicines10010174
- Leonardi M, Hicks C, El-Assaad F, El-Omar E, Condous G. Endometriosis and the microbiome: a systematic review. *BJOG.* 2020 Jan;127(2):239-249. DOI: 10.1111/1471-0528.15916
- Кириллова ЕД, Муравьева ВВ, Исаева ЕЛ, Скоробогатый АВ, Жигалова КН, Козлова АА, и др. Особенности микробиоты кишечника у пациенток с синдромом поликистозных яичников. *Вестник РАМН.* 2023;78(4):269-280. / Kirillova ED, Muravieva VV, Isaeva EL, Skorobogatyi AV, Zhigalova KN, Kozlova AA, et al. Features of the gut microbiota in patients with polycystic ovary syndrome. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2023;78(4):269-280. DOI: 10.15690/vramn6442 (In Russian).
- Кебурия ЛК, Смольникова ВЮ, Припутневич ТВ, Муравьева ВВ, Трофимов ДЮ, Шубина ЕС, и др. Микробиота полости матки и неудачи имплантации. Есть ли связь? Акушерство и гинекология. 2021;7:133-43. / Keburiya LK, Smol'nikova VYu, Priputnevich TV, Murav'eva VV, Trofimov DYU, Shubina ES, et al. Uterine microbiota and implantation failure: is there a link? *Obstetrics and Gynecology.* 2021;7:133-43. DOI: 10.18565/aig.2021.7.133-143 (In Russian).
- Huang L, Liu B, Liu Z, Feng W, Liu M, Wang Y, et al. Gut Microbiota Exceeds Cervical Microbiota for Early Diagnosis of Endometriosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Dec 7;11:788836. DOI: 10.3389/fcimb.2021.788836
- Maroun P, Cooper MJ, Reid GD, Keirse MJ. Relevance of gastrointestinal symptoms in endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009 Aug;49(4):411-4. DOI: 10.1111/j.1479-828X.2009.01030.x

16. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1792-801. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.043
17. Chiapparino F, Cipriani S, Ricci E, Mauri PA, Esposito G, Barretta M, et al. Endometriosis and irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2021 Jan;303(1):17-25. DOI: 10.1007/s00404-020-05797-8
18. Fusco V, Quero GM, Cho GS, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz CM. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol*. 2015 Mar 17;6:155. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00155
19. Ahmed S, Singh S, Singh V, Roberts KD, Zaidi A, Rodriguez-Palacios A. The *Weissella* Genus: Clinically Treatable Bacteria with Antimicrobial/Probiotic Effects on Inflammation and Cancer. *Microorganisms*. 2022 Dec 7;10(12):2427. DOI: 10.3390/microorganisms10122427
20. Horvath TD, Ihekweazu FD, Haidacher SJ, Ruan W, Engevik KA, Fultz R, et al. *Bacteroides ovatus* colonization influences the abundance of intestinal short chain fatty acids and neurotransmitters. *iScience*. 2022 Mar 25;25(5):104158. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104158
21. Singh V, Lee G, Son H, Koh H, Kim ES, Unno T, et al. Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Front Microbiol*. 2023 Jan 12;13:1103836. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1103836
22. You HJ, Si J, Kim J, Yoon S, Cha KH, Yoon HS, et al. *Bacteroides vulgatus* SNUG 40005 Restores Akkermansia Depletion by Metabolite Modulation. *Gastroenterology*. 2023 Jan;164(1):103-116. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.09.040
23. Zhou P, Yang D, Sun D, Zhou Y. Gut microbiome: New biomarkers in early screening of colorectal cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022 May;36(5):e24359. DOI: 10.1002/jcla.24359
24. Pollet RM, D'Agostino EH, Walton WG, Xu Y, Little MS, Biernat KA, et al. An Atlas of β -Glucuronidases in the Human Intestinal Microbiome. *Structure*. 2017 Jul 5;25(7):967-977.e5. DOI: 10.1016/j.str.2017.05.003
25. Anderson MT, Mitchell LA, Zhao L, Mobley HLT. *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. *Sci Rep*. 2018 Aug 7;8(1):11792. DOI: 10.1038/s41598-018-30196-0
26. Lee R, Choi SM, Jo SJ, Lee J, Cho SY, Kim SH, et al. Clinical Characteristics and Antimicrobial Susceptibility Trends in *Citrobacter* Bacteremia: An 11-Year Single-Center Experience. *Infect Chemother*. 2019 Mar;51(1):1-9. DOI: 10.3947/ic.2019.51.1.1
27. Lin Q, Duan H, Wang S, Guo Z, Wang S, Chang Y, et al. Endometrial microbiota in women with and without adenomyosis: A pilot study. *Front Microbiol*. 2023 Jan 20;14:1075900. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1075900
28. Itoh H, Sashihara T, Hosono A, Kaminogawa S, Uchida M. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 inhibits development of ectopic endometrial cell in peritoneal cavity via activation of NK cells in a murine endometriosis model. *Cytotechnology*. 2011 Mar;63(2):205-10. DOI: 10.1007/s10616-011-9343-z
29. Uchida M, Kobayashi O. Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the induced endometriosis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(9):1879-81. DOI: 10.1271/bbb.130319
30. Chadchan SB, Cheng M, Parnell LA, Yin Y, Schriefer A, Mysorekar IU, et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota. *Hum Reprod*. 2019 Jun 4;34(6):1106-1116. DOI: 10.1093/humrep/dez041

Информация о соавторах:

Гордеев Алексей Борисович, кандидат биологических наук, заведующий отделом молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Муравьева Вера Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Скоробогатый Алексей Викторович, младший научный сотрудник отделения клинической фармакологии антимикробных и иммунобиологических препаратов Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Жигалова Ксения Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Денисов Павел Александрович, научный сотрудник лаборатории биоинформационного анализа Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Чернуха Галина Евгеньевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения гинекологической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Припутневич Татьяна Валерьевна, чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России; профессор кафедры микробиологии и вирусологии Педиатрического факультета ФGAOY BO «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России

Information about co-authors:

Alexey B. Gordeev, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Vera V. Muravieva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Alexey V. Skorobogatiy, Junior Researcher of the Clinical Pharmacology of Antimicrobial and Immunobiological drugs Unit, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Ksenia N. Zhigalova, Junior Researcher of the Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Pavel A. Denisov, Researcher of the Laboratory of bioinformatics, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Galina E. Chernukha, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Researcher, Department of gynecological endocrinology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Tatiana V. Pripudnevich, MD, PhD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology and Virology, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation