

МИКРОБИОТА И РЕПРОДУКЦИЯ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (обзор)

Д.В. ПОПОВ[✉]

Использование специализированных пород животных сельскохозяйственных видов часто сопровождается снижением репродуктивного успеха. В молочном скотоводстве растет количество дней сервис-периода, процедур искусственного осеменения на одну стельность, частоты потерь стельности (С.В. Гуськова с соавт., 2014). Накопленные данные по получению эмбрионов методами *in vivo* и *in vitro* и их трансплантации свидетельствуют о значительных (30-60 %) потерях эмбрионов (P.J. Hansen, 2020). Причины низких показателей при применении репродуктивных технологий разнообразны и связаны как с биотическими, так и абиотическими факторами, при этом одним из ключевых при потерях эмбрионов может быть дисбаланс микробных сообществ в отделах репродуктивной системы как самок-доноров, так и самок-реципиентов. Изучение состава микробиоты различных отделов и систем многоклеточного организма в последнее время становится все более доминирующей темой в научной литературе. С появлением современных методов идентификации микробов, например метагеномного секвенирования, выявлено большое микробное разнообразие в разных анатомических отделах макроорганизмов. Накоплены данные о микробном составе и его динамике в органах репродуктивной системы, его связях с воспроизводством у млекопитающих, репродуктивным успехом, протеканием беременности, прогнозированием возможностей возникновения патологических процессов. В работе рассматриваются результаты исследований влияния микробиоты на успешность применения репродуктивных технологий, таких как экстракорпоральное оплодотворение, трансплантация эмбрионов, искусственное осеменение. Обсуждается (F. Marco-Jiménez с соавт., 2020) влияние симбиотических бактерий на фертильность и качество семени. Для млекопитающих это направление малоизучено, и крайне необходимо расширять изучение микробиоты репродуктивного тракта сельскохозяйственных животных. Результаты таких исследований дадут дополнительное понимание репродуктивных процессов и представление о причинах неудачных случаев и о положительных исходах воспроизводства. При этом практическое применение такой информации увеличит шансы успешно применять репродуктивные биотехнологии, снизит затраты, связанные с воспроизводством и терапевтическими вмешательствами при лечении патологий репродуктивной системы, а также откроет возможность для разработки и практического применения новых методов, в частности микробной терапии. Итак, можно сделать вывод, что микробиота органов репродуктивной системы млекопитающих оказывает влияние на физиологические процессы размножения (R. Koedoeder с соавт., 2019), и при этом очевидно, что, имея возможность управлять микробными сообществами, человек может повысить шансы наступления репродуктивного успеха при воспроизводстве высокоспециализированных пород сельскохозяйственных животных (P.J. Hansen, 2020; R.W. Нупан с соавт., 2012; D.E. Moore с соавт., 2000).

Ключевые слова: эндометрий, микробиота, микробиом, репродуктивная система, сперма, матка, репродуктивные технологии.

Воспроизводство поголовья на любом животноводческом предприятии представляет собой основной технологический этап обеспечения успешности его деятельности. Развитие прогрессивных технологий, законы рыночной экономики, конкуренция определили переход большинства современных сельскохозяйственных предприятий с экстенсивного на интенсивный путь развития. С этой целью создают стада, состоящие из специализированных высокопродуктивных пород, и практически в каждой отрасли животноводства для воспроизводства поголовья применяют репродуктивные биотехнологии — искусственное осеменение, получение эмбрионов методами *in vivo* и *in vitro*, трансплантацию эмбрионов и т.д. В то же время увеличение специализации животных по направлению продуктивности неизбежно приводит к снижению потенциала их биологических характеристик, таких как адаптивные качества, репродуктивное долголетие, репродуктивный успех (1, 2). Работы последних лет, направленные на изучение микроб-

ных сообществ органов, отделов и систем многоклеточного организма, свидетельствуют о том, что дисбаланс в составе микробиоты может привести к негативным явлениям и проявиться в форме острых патологических процессов или функциональном нарушении в одной или нескольких физиологических системах организма.

Все ткани и органы многоклеточного организма колонизированы сосуществующим с ним микробным сообществом, состав которого включает бактерии, вирусы, грибы, дрожжи, археи и простейших (3). Разнообразие микроорганизмов в пределах той или иной физиологической системы макроорганизма определяется как видовой состав микробного сообщества — микробиоты (4). Преобладающий по количеству вид микроорганизмов называют доминирующим, и каждый орган или система в макроорганизме имеет свой собственный характерный состав микробных ассоциаций. Разнообразие микроорганизмов обозначается как альфа- и бета-разнообразие. Альфа-разнообразие характеризует среднее видовое разнообразие в интересующем образце, в то время как бета-разнообразие отражает разнообразие между разными образцами (5). Компоненты микробиоты оказывают влияние как на макроорганизм, так и друг на друга. Взаимоотношения между ними могут быть мутуалистическими (взаимовыгодными), комменсальными и паразитическими. Совокупность геномов этих сообществ определяют как микробиом (3, 4). С появлением методов секвенирования консервативного бактериального гена 16S рPHK (6, 7), нового поколения секвенирования (next-generation sequencing, NGS) (8-10), полногеномного секвенирования (whole genome sequencing, WGS) (11, 12), количественной ПЦР (quantitative PCR, qPCR) (13, 14) получен большой объем данных о новых генах, организациях геномов и структурах бактериальных сообществ. Для обработки таких данных доступны биоинформационные ресурсы, например *mothur* (15) и *Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)* (16). Основная функция этих информационных систем состоит в объединении полученных последовательностей ДНК в операционные таксономические единицы (operational taxonomic units, OTU) различными методами (17, 18) с использованием внешних справочных баз данных — *Greengenes* (19), *SILVA* (20), *Ribosomal Database Project* (21). В то же время отмечается, что недостатки, связанные с методическими особенностями проведения исследований, анализа и интерпретации полученных данных, могут негативно сказаться на объективности и качестве результатов (22-25).

В настоящее время наиболее исследован микробиом различных систем и органов человека (5), тогда как микробные сообщества органов репродуктивной системы млекопитающих сельскохозяйственных видов изучены недостаточно.

Цель нашего обзора — проанализировать актуальные публикации по микробиоте репродуктивного тракта, описывающие состав микробных сообществ в различных анатомических отделах (влагалище, шейка матки, эндометрий и плацента) млекопитающих, и рассмотреть предполагаемые механизмы взаимосвязи между аномальным составом микробиоты органов воспроизводства и репродуктивным успехом у млекопитающих сельскохозяйственных видов.

Микробиота и многоклеточный организм. Накопленная информация о микробиоте различных видов и пород помогает расширить представление о процессах эволюции и доместикации. Так, получены данные, свидетельствующие о том, что наиболее универсальные показатели синдрома доместикации — изменение поведенческих характеристик (снижение агрессивности, повышение социализации) (26, 27) и существенное

расширение фенотипической и популяционно-генетической изменчивости (28) могут проявляться и быть тесно связаны друг с другом из-за изменений микробиоты животных, формируемой в одной экологической нише вместе с человеком (26). Микробиота желудочно-кишечного тракта млекопитающих получила название «забытого органа» (29), и ее изучение стало основой развиваемой в последние годы теории о роли микробиоты в процессах эволюции (30). Каждый вид млекопитающих содержит кишечную микробиоту, изменчивость которой ассоциирована с процессами адаптации и диверсификации животных, способствуя возможностям изменения типа питания, фенотипической пластичности, работе врожденного и адаптивного иммунитета. Микробиота кишечника служит важной мишенью действия факторов окружающей среды и селективным агентом, формирующим адаптивную эволюцию рациона млекопитающих, фенотипическую пластичность, морфологию желудочно-кишечного тракта и иммунитет (30). Концепция о роли взаимодействий между многоклеточным организмом и микробиотой в процессе эволюции получила название хологеномной теории эволюции, в которой взаимоотношения между ними рассматриваются как основная мишень геномных преобразований под влиянием факторов окружающей среды (31). Сравнительный анализ микробиоты диких и близкородственных одомашненных видов дает представление о том, как одомашнивание могло повлиять на состав микробных ассоциаций у сельскохозяйственных животных. Например, сравнительное изучение микробиоты домашних свиней и диких кабанов показало, в частности, что некоторые представители *Enterobacteriaceae*, которые считаются доминирующими бактериальными группами в кишечной микробиоте свиней, не встречаются у диких кабанов. Интересно, что у недавно одомашненных диких кабанов обнаружен соответствующий сдвиг в видовой представленности *Enterobacteriaceae*. В совокупности это предполагает, что состав и структура кишечной микробиоты домашних свиней может отражать методы управления этим сектором животноводства. Показано также, что у крупного рогатого скота инокуляция содержимым рубца бизона повышает переваримость белка и удержание азота, но не перевариваемость клетчатки, это позволяет сделать предположение о способности микробных сообществ желудочно-кишечного тракта предков сельскохозяйственных животных использовать азот растительной кормовой массы для биосинтеза аминокислот (32).

Проводимые микробиомные исследования направлены на то, чтобы выявить недостающие детали в патофизиологических процессах и объяснить кажущиеся случайными вариации тяжести заболевания и фенотипических проявлений в связи, например, с такими факторами, как эколого-географические и кормовые. Благодаря достижениям в изучении микробных сообществ была получена важная информация, что бактериальный дисбиоз может приводить, в частности, к нарушениям в деятельности нервной системы (33, 34). Имеются данные, свидетельствующие о роли микробиоты при многих сложных расстройствах — ожирении, раке и воспалительных заболеваниях кишечника (35). В настоящее время известно, что микробиота кишечника существенно влияет на общий метаболизм и иммунные реакции хозяина (36). Внешние факторы (антибиотики, диета и географическое положение) могут оказывать критическое воздействие на состав микробиоты кишечника (37).

Аналогичная тенденция наблюдается в микробиоте репродуктивной системы как при физиологических, так и при патологических состояниях (38). Репродуктивная система многоклеточных организмов — основная структура, определяющая воспроизводство биологического объекта. При

изучении микробных сообществ репродуктивных органов, в частности у человека, было показано, что различия между биообразцами в пределах одной физиологической системы (бета-разнообразии) были значительно больше, чем различия образцов, полученных из одного органа (альфа-разнообразии). Влагалищная микробиота у млекопитающих характеризовалась наименьшим альфа-разнообразием с относительно низким бета-разнообразием на уровне рода, но очень высоким разнообразием среди исследованных таксономических единиц из-за преобладания лактобацилл.

Установлено, что симбиотические отношения между хозяином и микроорганизмами необходимы и нарушение этих отношений может привести к дисбиотическому состоянию (39, 40). Например, бактериальный вагиноз характеризуется сдвигом от здорового состояния с низким значением pH в сообществе с преобладанием лактобацилл к повышению pH и более разнообразному микробному сообществу (41). Однако сдвиги между симбиозом и дисбиозом и наоборот до сих пор недостаточно исследованы.

У животных сельскохозяйственных видов эти вопросы очень важны, поскольку связаны с репродукцией и, следовательно, имеют существенное экономическое значение, непосредственно влияя на эффективность животноводства (42).

Микробные сообщества репродуктивной системы у самок млекопитающих. У млекопитающих репродуктивные органы как у самок, так и у самцов представляют собой системы, разделенные анатомическими или физиологическими барьерами. У самок репродуктивный тракт состоит из следующих отделов: влагалище, шейка матки и полость матки, рога матки, яйцеводы и яичники. Накапливается все больше и больше свидетельств, указывающих на то, что определенные бактериальные сообщества неодинаково влияют на репродуктивное здоровье и репродуктивный успех. Так, у человека обнаружен специфический микробный состав, который различается в отделах репродуктивной системы (3, 43). Как было установлено, количество бактерий, локализующихся в эндометрии, значительно меньше по сравнению с их количеством во влагалище, что позволяет сделать предположение, что шейка матки выполняет функции защитного барьера для восходящей микробиоты (44).

Микробиоту влагалища можно разделить на пять (I-V) основных типов состояния сообщества (community state types, CST), в четырех из них преобладают лактобациллы. В I группе преобладает вид *Lactobacillus crispatus* (26,2 %), во II группе — *L. gasseri* (6,3 %), в III группе — *L. iners* (34,1 %) и в V группе — *L. jensenii* (5,3 %) (45, 46). В IV группе нет доминирования лактобацилл, но присутствует множество более строгих анаэробов (47). CST IV-A характеризуется наличием некоторых видов *Lactobacillus* spp. и разнообразием строго анаэробных бактерий, в сообществе IV-B сочетаются представители родов *Atopium*, *Prevotella*, *Sneathia* и *Gardnerella* (48). Исследования А.У.К. Albert с соавт. (49) расширили представления о диапазоне бактериальных сообществ. Авторы, изменив методический подход, выявили, что в сообществах преобладают подгруппы *Gardnerella* (CST IV-C и IV-D) (49).

Обнаружено, что микробиота влагалища динамична, поскольку видовой состав сообществ со временем претерпевает модификации. Известно, что CST IV-B часто меняется на CST III, но редко на CST I, CST I часто меняется на CST III или CST IV-A, CST III меняется в 2 раза чаще на CST IV-B по сравнению с CST IV-A, CST II редко меняется, при этом никаких изменений с CST I на CST II не наблюдалось, а CST II относительно стабилен по сравнению с CST IV-A.

Разница в микробном составе также отражается на вагинальном pH.

CST I предположительно имеет самый низкий медианный pH ($4,0 \pm 0,3$), в то время как CST IV — самый высокий pH ($5,3 \pm 0,6$). Разница в pH между различными CST, скорее всего, объясняется специфическим доминированием лактобацилл и способностью каждой лактобациллы продуцировать молочную кислоту (50).

Влагалищная микробиота небеременных здоровых женщин может меняться в зависимости от ряда характеристик: периоды полового цикла (эструс, овуляция и т.д.), этнического происхождения, эколого-географических факторов (47, 48, 51-53).

Существенное влияние на состав микробиоты оказывает гормональный статус; например показано, что во время беременности изменение микробного состава является реакцией на повышение уровня эстрогена (54).

Во время беременности уменьшается обилие и биоразнообразие микробиоты влагалища, в то время как ближе к родам возвращается в состояние, характерное для небеременных женщин (54, 55). Установлено преобладание *Lactobacillus* spp. во время беременности (54, 56), что снижает риски наступления преждевременных родов (57) и служит защитой от бактериального вагиноза (47), в то же время без доминирования *Lactobacillus* spp. повышается численность условно-патогенной микробиоты — представителей *Gardnerella* или *Ureaplasma*, что может повысить риск преждевременных родов (58).

Важное свойство лактобацилл, с которым связана их способность препятствовать росту других бактерий, — выработка бактериоцинов (57). Как уже отмечалось, лактобациллы синтезируют как D-, так и L-изомеры молочной кислоты, в то время как сам макроорганизм способен производить только L-изомер (48, 50, 59). Основным благоприятным эффектом D-молочной кислоты — снижение активности матриксной металлопротеиназы (ММП)-8, что позволяет цервикальной пробке сохранять целостность и тем самым ограничивает вертикальную передачу вагинальных бактерий в матку. Лактобактерии выполняют функцию механического барьера, связываясь с поверхностью эпителиальных клеток, предотвращая прикрепление других бактерий (60).

Микробиота и репродуктивное здоровье. Накопленные данные позволяют говорить о том, что видовой и количественный состав микробных сообществ влияет на репродуктивное здоровье у млекопитающих. Например, проблемы бесплодия часто связаны со снижением обилия лактобактерий в шейке матки (61). Установлено, что наличие определенных бактерий (в частности, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma vaginae*, *U. parvum*, *U. urealyticum* и гарднерелл) и снижение частоты видов семейства *Mycoplasmataceae* по сравнению с микробиотой у здоровых особей приводит к высокой распространенности бессимптомного бактериального вагиноза (62, 63).

При бесплодии из-за инфекции (61) обнаружено снижение численности лактобацилл и более высокое разнообразие микроорганизмов в шейке матки, при этом значительно увеличилось число детекций *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Leptotrichia*, *Sneathia* по сравнению с контролем при нормальной фертильности (61, 64). Установлено, что бактериальный вагинит — наиболее распространенное заболевание влагалища микробной этиологии, описанное как полибактериальный дисбиоз (65), поражающий 30 % женщин в репродуктивном возрасте (66). Анаэробы, в частности *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus*, *Mollicutes*, *Dialister invisus*, *Sneathia*, *Prevotella* spp., рассматриваются как возможные патогены при бактериальном вагините (67). Отмечается, что при этой патологии бактериальный состав вагинальной микробиоты более разнообразен (68). Важно отме-

тить, что бактериальный вагинит ассоциируется с неблагоприятными репродуктивными исходами — бесплодием, выкидышами (69), повторной потерей беременности (70) и преждевременными родами (67).

Микробиота репродуктивной системы сельскохозяйственных животных на примере крупного рогатого скота. Изучение микробиоты репродуктивной системы сельскохозяйственных животных важно для понимания роли микроорганизмов в патологических процессах, связанных с воспроизводством. Например, в исследовании коров с гнойными выделениями из матки была установлена значительная положительная корреляция между наличием *Trueperella pyogenes* и клиническим эндометритом, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica* и *Bacteroides* spp. — с метритом. У здоровых коров обычно выявляли *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и *Bacillus* spp. Изучение микробиоты матки коров показало, что наиболее многочисленны бактерии, представленные семействами *Porphyromonadaceae*, *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*, при этом корова может вынашивать беременность, несмотря на присутствие в матке потенциально патогенных бактерий (71).

Изучение влияния *Trueperella pyogenes* на репродуктивную функцию коров показало, что при эндометрите, вызванном этим возбудителем, частота успешной стельности на 47 % ниже, а средние сроки ее наступления на 57 сут больше, чем у здоровых коров (72). С использованием ПЦР-анализа установлено, что в микробиоте репродуктивных органов коров с метритом и клиническим эндометритом *Escherichia coli* выполняет роль предшествующего патогена, который предрасполагает коров к инфицированию *F. necrophorum* (ассоциирован с метритом) и *T. pyogenes* (ассоциирован с клиническим эндометритом).

Применение метагеномного секвенирования расширило знания о микробиоте матки коров. Установлено, что у коров бактерии присутствуют в матке еще до отела. При этом у животных с развивающимся метритом и здоровых особей структура микробных ассоциаций идентична до 2-х сут послеродового периода, после чего микробное сообщество матки особей с метритом изменяется в сторону большей относительной численности представителей *Bacteroidetes* и *Fusobacteria* и меньшей — *Proteobacteria* и *Tenericutes*. Обнаружено, что потенциальный путь инфицирования маточными патогенами гематогенный и что метрит связан с дисбактериозом микробиоты матки, характеризующимся пониженным разнообразием и увеличением количества *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*, особенно *Bacteroides*, *Porphyromonas* и *Fusobacterium* (73-75). Кроме того, изучение эндометритов коров позволило выявить существенное влияние изменчивости структуры микробиоты на иммунитет и общую резистентность животных к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Установлено, что при эндометрите воспалительная реакция, вызванная грамотрицательными бактериями *E. coli*, влияет на экспрессию микроРНК (miRNA), вовлеченную в регуляцию звеньев врожденного иммунитета (76). Интересно отметить, что доминирование лактобацилл в составе микробиоты влагалища уникально для человека как биологического вида, в то время как у других млекопитающих (в том числе приматов) влагалищная микробиота редко характеризуется доминированием лактобацилл, при этом pH влагалища у женщин всегда ниже, чем у самок остальных млекопитающих (77). В то же время в исследовании J.D. Swartz с соавт. (78) делается акцент на том, что лактобациллы были обычным явлением и обнаруживались в вагинальных пробах у 80 % коров (16 особей при выборке $n = 20$) и 90 % овец (18 особей при выборке $n = 20$), при этом лактобациллы всегда имели низ-

кую относительную численность (соответственно $0,36 \pm 0,66$ и $0,53 \pm 0,65$ % популяции при оценке по гену 16S рРНК) и рН практически всегда был нейтральным (78).

Микробиота и репродуктивные технологии. Изучение микробных сообществ репродуктивной системы важно для успешного применения репродуктивных биотехнологий — экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), трансплантации эмбрионов и т.д. Так, доминирование лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri* или других видов лактобацилл) в микробиоте влагалища в цикле до трансплантации эмбриона связывают с положительным исходом процедуры (79, 80). Однако некоторые вагинальные микробные сообщества отрицательно влияют на наступление беременности (79, 81). Увеличение численности условно-патогенной микрофлоры в половых путях всегда коррелирует со снижением частоты видов лактобацилл, что приводит к снижению показателей успешности применения методов репродуктивной биотехнологии (82, 83).

В качестве причины неблагоприятного результата при процедуре ЭКО рассматривается возможность колонизации фолликулярной жидкости микроорганизмами во время извлечения яйцеклеток. Отрицательные исходы беременности отмечены при наличии в яичниках *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp. и *Streptococcus* spp. и, напротив, положительные — когда в яичниках выявляются *Lactobacillus* spp. (80). Ранее было продемонстрировано, что присутствие *Streptococcus viridans* на инструментах для подсадки эмбрионов связано с неблагоприятными исходами процедуры (80).

Микробиота верхних отделов репродуктивного тракта связана с вероятностью зачатия как в естественных условиях, так и при применении репродуктивных технологий. Проблемы с зачатием могут быть обусловлены изменениями в структуре микробиоты из-за проникновения патогенов из влагалища в верхние отделы репродуктивной системы, что приводит к дисбалансу во внутриматочной среде (82). Созданию благоприятных условий для имплантации эмбриона и наступления беременности способствуют лактобациллы благодаря их защитным и поддерживающим свойствам (48, 50, 59, 85). Результаты недавних исследований связывают репродуктивный успех с преобладанием (> 90 %) лактобактерий в микробном профиле эндометрия (86). В то же время установлено, что доминирование родов *Gardnerella* (сем. *Bifidobacteriaceae*) и стрептококков (сем. *Streptococcaceae*) в эндометрии связано со значительным снижением вероятности имплантации и благоприятных родов (86).

Описаны микробиомные профили эндометрия, которые могут быть связаны с хроническим эндометритом (87, 88), ассоциированным с предрасположенностью к развитию бесплодия при эндометриозе (87), и определяют повторные неудачи имплантации (87, 88). В то же время имеются данные об ограниченной роли микробного ландшафта цервикального канала и эндометрия во время переноса эмбриона и отсутствии существенного микробного влияния на вероятность наступления беременности (85, 87). Сообщалось, что при профилактическом применении антибиотиков последующая частота наступления беременности не изменялась (92). В ряде исследований (93) также не обнаружили статистически значимых различий в частоте наступления репродуктивного успеха между получавшими антибиотики до переноса эмбрионов и теми пациентками, которые не подвергались антибиотикотерапии.

Микробиота и беременность. Микробиота репродуктивного

тракта продолжает играть определенную роль после наступления беременности (94). Дисбактериоз во влагалище, эндометрии или плаценте может привести к неблагоприятному исходу беременности.

В конце 1-го триместра микробиота влагалища в основном состоит из лактобактерий — *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* или *L. Jensenii* (95). Преждевременные роды (до 34 нед) с высокой долей вероятности связаны с доминирующим присутствием *L. iners* на 16-й нед беременности, тогда как преобладание *L. crispatus* предположительно служит индикатором благополучного исхода беременности.

При аномальной колонизации влагалища возбудителями клебсиеллезной пневмонии во 2-м триместре возрастает риск преждевременных родов (до 28 нед), а колонизация *Streptococcus agalactiae* во 2-м триместре приводит к повышению вероятности поздних выкидышей (96, 97).

Эмбриональное развитие и рост в значительной степени зависят от функции плаценты. Когда-то плаценту считали стерильной, однако, как было обнаружено, она обладает собственной уникальной микробиотой. У человека в матке и плаценте установлено значительное присутствие непатогенной комменсальной микробиоты типов *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria* (98).

Манипуляции, приводящие к изменению структуры микробиоты матки, могут помочь модулировать местную иммунную систему при подготовке к имплантации эмбриона и формировании плаценты (99), что способно прямо повлиять на развитие преэклампсии (96).

Микробиота спермы и репродуктивное здоровье. У самцов репродуктивная система представлена внешней частью (половой член и мошонка) и внутренней частью (семенники, придаточные железы, семявыносящие протоки и мочеиспускательный канал).

Недавние анализы показали, что микробиота семенной жидкости, скорее всего, формируется объединением микробных сообществ всех отделов мужского репродуктивного тракта. Метод NGS показал, что бактериальные сообщества семени разделены на три группы, в которых преобладают либо лактобациллы, либо синегнойные палочки, либо превотеллы. Важно отметить, что 80 % качественных образцов спермы принадлежали к группе, в которой преобладали лактобациллы (100). Установлено, что низкая концентрация и аномальная морфология сперматозоидов связаны с наличием *Mycoplasma* spp. (101, 102). Частота *Mycoplasma hominis* значительно выше у бесплодных мужчин, чем у фертильных, также показано, что антибактериальная терапия улучшает качество спермы у бесплодных мужчин (103).

Аналогично репродуктивному тракту самок, в мужском при репродуктивных заболеваниях уменьшатся обилие лактобактерий при более высоком видовом разнообразии микробного сообщества (104). Увеличение числа нейссерий, клебсиелл и синегнойных палочек и снижение количества лактобацилл было связано с повышенной вязкостью семенной жидкости и олигоастенотератозооспермией (105), следовательно, заболевания, передающиеся половым путем, снижают не только женскую, но и мужскую фертильность. При изучении влияния микробиоты семени на репродуктивный успех у кроликов было установлено, что *Lysinibacillus* и *Flavobacterium* могут выступать маркерами потенциальной плодовитости (106).

Очевидно, что микробиоты обоих полов влияют друг друга и, видимо, взаимодействуют. Сравнение семенных и вагинальных микробиот у обследованных пар выявило большое число общих ДНК маркеров для компонентов микробиот (107). Среди общих компонентов микробиот

наиболее распространенными родами были *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Atopobium vagine*. Хотя микробные сообщества семени были более разнообразными, общая концентрация бактерий в сперме оказалась ниже, чем в вагинальных сообществах. Микробиота спермы значительно, хотя и временно, влияет на микробиоту влагалища (108). Более ранние исследования не показали влияния на вагинальные лактобактерии и pH через 8-12 ч после коитуса, при этом во влагалище было обнаружено значительно больше кишечной палочки (109). Предполагается, что физиологическое посткоитальное временное состояние влагалищного микробиома, при котором вагинальные лактобациллы замещаются на *Gardnerella vaginalis* под влиянием эякулята, приводит к изменению pH (110). Обширные исследования на грызунах показали, что воздействие семенной жидкости приводит к появлению спектра цитокинов в репродуктивном тракте самок, изменяющего восприимчивость эндометрия и динамику развития эмбриона до имплантации (111). К сожалению, взаимодействие и влияние друг на друга между микробиотами репродуктивных систем самцов и самок млекопитающих до сих пор остаются малоизученными. При анализе влияния микробиоты на репродуктивный успех одним из направлений может стать изучение временного комбинированного микробного сообщества женской и мужской репродуктивных системы, которое формируется в посткоитальный период и, возможно, даже сохраняется в предимплантационный период, что может способствовать успешному зачатию и протеканию беременности.

Итак, становится очевидным, что микробиота служит фактором, объединяющим все физиологические системы организма. Любые изменения в микробных сообществах на уровне системы или даже органа приводят к возникновению патологических процессов. В настоящее время накопление данных о микробиомах животных сельскохозяйственных видов имеет как теоретическое, так и практическое значение. Это научное направление остается актуальным и перспективным, поскольку продуктивность и адаптивный потенциал ценных сельскохозяйственных видов и пород животных могут быть улучшены целенаправленным изменением качественного и количественного состава их микробных сообществ. Изучение микробных сообществ органов репродуктивной системы у сельскохозяйственных животных позволит получить новые данные о физиологии воспроизводства, повысить вероятность репродуктивного успеха при применении методов репродуктивной биотехнологии, а также снизить связанные с этим затраты и применить новые методы лечения, например микробную терапию. Уже сегодня накопленные материалы свидетельствуют о необходимости усилить биологический контроль микробиоты при производстве семени, применении технологий *in vitro* и *in vivo* для получения эмбрионов сельскохозяйственных животных. Кроме того, к важным научным направлениям относится изучение состава микробных сообществ репродуктивных органов производителей и возможности снижать прогнозируемые потери эмбрионов при предварительной колонизации определенными видами бактерий отделов репродуктивной системы самок-доноров и самок-реципиентов.

ФГБНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства
им. В.А. Афанасьева,
140143 Россия, Московская обл., Раменский р-н, пос. Родники,
ул. Трудовая, 6,
e-mail: popov.bio@gmail.com ✉

Поступила в редакцию
13 октября 2021 года

MICROBIOTA AND REPRODUCTION IN AGRICULTURAL MAMMALS (review)

D.V. Popov[✉]

Afanas'ev Research Institute of Fur-Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, 6, ul. Trudovaya, pos. Rodniki, Ramenskii Region, Moscow Province, 140143 Russia, e-mail popov.bio@gmail.com (✉ corresponding author)

ORCID:

Popov D.V. orcid.org/0000-0001-7422-5470

The author declares no conflict of interests

Received October 13, 2021

doi: 10.15389/agrobiology.2022.2.222eng

Abstract

The use of specialized animal breeds of agricultural species is often accompanied by a decrease in reproductive success. In dairy cattle breeding, the number of service-period days, artificial insemination procedures per pregnancy, and the frequency of pregnancy losses are increasing (S.V. Guskova et al., 2014). Accumulated data on obtaining embryos by *in vivo* and *in vitro* methods and their transplantation indicate a significant level (30-60 %) of embryo losses (P.J. Hansen, 2020). The reasons for low rates in reproductive technologies are diverse and associated with both biotic and abiotic factors, and one of the key factors of embryo losses may be the imbalance of microbial communities in the reproductive system sections of both female donors and recipients. The study of the microbiota composition of various departments and systems of the multicellular organism has recently become an increasingly dominant topic in the scientific literature. Modern methods of microbial identification, e.g., metagenomic sequencing, reveals great microbial diversity in various anatomical departments of macroorganisms. The accumulated data show the microbial composition, dynamics in the organs of the reproductive system, and its relationship with the reproduction of mammals, reproductive success, the course of pregnancy, the prognosis of the possibilities of pathological processes. The review focuses on the impact of microbiota on the success of reproductive technologies, e.g., *in vitro* fertilization, embryo transplantation, and artificial insemination. For example, F. Marco-Jiménez et al. (2020) discuss the effect of symbiotic bacteria on fertility and semen quality. The understudied nature of this area for mammals and the extreme need for additional research on the microbiota of the reproductive tract of farm animals, the results of which will provide insight and insight into the unsuccessful and positive outcomes of reproduction, are noted. At the same time, the practical application of this information will increase the chances of success in reproductive biotechnology, reduce the costs associated with reproduction and therapeutic interventions in the treatment of pathological processes of the reproductive system, and open up the possibility of developing and implementing new methods such as microbial therapy. Thus, it can be concluded that the microbiota of mammalian reproductive system and organs influence the physiological processes of reproduction (R. Koedooder et al., 2019). It is clear that by being able to manage microbial communities, humans can increase the chances of reproductive success in the reproduction of highly specialized breeds of farm animals (P.J. Hansen, 2020; R.W. Hyman et al., 2012; D.E. Moore et al., 2000).

Keywords: endometrium, microbiota, microbiome, reproductive system, sperm, uterus, reproductive technology.

REFERENCES

1. Gus'kova S.V., Turbina I.S., Eskin G.V., Kombarova N.A. *Myasnoe i molochnoe skotovodstvo*, 2014, 3: 10-13 (in Russ.).
2. Hansen P.J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J. Anim. Sci.*, 2020, 98(11): skaa288 (doi: 10.1093/jas/skaa288).
3. Koedooder R., Mackens S., Budding A., Fares D., Blockeel C., Laven J., Schoenmakers S. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Human Reproduction Update*, 2019, 25(3): 298-325 (doi: 10.1093/humupd/dmy048).
4. Marchesi J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 2015, 3: 31 (doi: 10.1186/s40168-015-0094-5).
5. Stoma I.O., Karpov I.A. *Mikrobiom cheloveka* [Human microbiome]. Minsk, 2018 (in Russ.).
6. Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1985, 82(20): 6955-6959 (doi: 10.1073/pnas.82.20.6955).
7. Gray M.W., Sankoff D., Cedergren R.J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(14): 5837-5852 (doi: 10.1093/nar/12.14.5837).
8. Metzker M.L. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.*, 2005, 15: 1767-1776

(doi: 10.1101/gr.3770505).

9. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.-J., Chen Z. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380 (doi: 10.1038/nature03959).
10. Loman N.J., Misra R.V., Dallman T.J., Constantinidou C., Gharbia S.E., Wain J., Pallen M.J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.*, 2012, 30(5): 434-439 (doi: 10.1038/nbt.2198).
11. Ranjan R., Rani A., Metwally A., McGee H.S., Perkins D.L. Analysis of the microbiome: advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, 469(4): 967-977 (doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.083).
12. Roumpeka D.D., Wallace R.J., Escalettes F., Fotheringham I., Watson M. A review of bioinformatics tools for bio-prospecting from metagenomic sequence data. *Frontiers in Genetics*, 2017, 8: 23 (doi: 10.3389/fgene.2017.00023).
13. Ott S.J., Musfeldt M., Ullmann U., Hampe J., Schreiber S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(6): 2566-2572 (doi: 10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004).
14. Malinen E., Kassinen A., Rinttilä T., Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 2003, 149: 269-277 (doi: 10.1099/mic.0.25975-0).
15. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541 (doi: 10.1128/AEM.01541-09).
16. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010, 7: 335 (doi: 10.1038/nmeth.f.303).
17. Edgar R.C. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, 2018, 34: 2371-2375 (doi: 10.1093/bioinformatics/bty113).
18. Westcott S.L., Schloss P.D. De novo clustering methods outperform reference based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. *PeerJ*, 2015, 3: e1487 (doi: 10.7717/peerj.1487).
19. McDonald D., Price M.N., Goodrich J., Nawrocki E.P., DeSantis T.Z., Probst A., Andersen G.L., Knight R., Hugenholtz P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.*, 2012, 6: 610-618 (doi: 10.1038/ismej.2011.139).
20. Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(21): 7188-7196 (doi: 10.1093/nar/gkm864).
21. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl_1): D141-D145 (doi: 10.1093/nar/gkn879).
22. Chen W., Zhang C.K., Cheng Y., Zhang S., Zhao H. A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. *PLoS ONE*, 2013, 8: e70837 (doi: 10.1371/journal.pone.0070837).
23. Nguyen N.P., Warnow T., Pop M., White B. A perspective on 16 S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2: 16004 (doi: 10.1038/npjbiofilms.2016.4).
24. Haas B.J., Gevers D., Earl A.M., Feldgarden M., Ward D.V., Giannoukos G., Ciulla D., Tabbaa D., Highlander S.K., Sodergren E., Methé B., DeSantis T.Z., Human Microbiome Consortium, Petrosino J.F., Knight R., Birren B.W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.*, 2011, 21(3): 494-504 (doi: 10.1101/gr.112730.110).
25. D'Amore R., Ijaz U.Z., Schirmer M., Kenny J.G., Gregory R., Darby A.C., Shakya M., Podar M., Quince C., Hall N. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16 S rRNA community profiling. *BMC Genomics*, 2016, 17: 55 (doi: 10.1186/s12864-015-2194-9).
26. Glazko V.I., Zybailov B.L., Kosovsky G.Yu., Glazko G.V., Glazko T.T. Domestication and microbiome *The Holocene*, 2021, 31(10): 1635-1645 (doi: 10.1177/09596836211025975).
27. Wilkins A.S. A striking example of developmental bias in an evolutionary process: The "domestication syndrome". *Evolution & Development*, 2020, 22(1-2): 143-153 (doi: 10.1111/ede.12319).
28. Glazko V., Zybailov B., Glazko T. Asking the right question about the genetic basis of domestication: what is the source of genetic diversity of domesticated species? *Adv. Genet. Eng.*, 2015, 4(2): 1000125 (doi: 10.4172/2169-0111.1000125).

29. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, 2006, 7(7): 688-693 (doi: 10.1038/sj.embor.7400731).
30. Kolodny O., Callahan B.J., Douglas A.E. The role of the microbiome in host evolution. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2020, 375(1808): 20190588 (doi: 10.1098/rstb.2019.0588).
31. Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, 32(5): 723-735 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123).
32. Ikeda-Ohtsubo W., Brugman S., Warden C.H., Rebel J.M.J., Folkerts G., Pieterse C.M.J. How can we define "optimal microbiota?": a comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Front. Nutr.*, 2018, 5: 90 (doi: 10.3389/fnut.2018.00090).
33. Douglas-Escobar M., Elliott E., Neu J. Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. *JAMA Pediatr.*, 2013, 167(4): 374-379 (doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.497).
34. Bercik P., Denou E., Collins J., The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, 2011, 141(2): 599-609 (doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.052).
35. Knight R., Callewaert C., Marotz C., Hyde E.R., Debelius J.W., McDonald D., Sogin M.L. The microbiome and human biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2017, 18: 65-86 (doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022438).
36. Li J.V., Swann J., Marchesi J.R. Biology of the microbiome 2: metabolic role. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2017, 46(1): 37-47 (doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.006).
37. Doré J., Blottière H. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 32: 195-199 (doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.002).
38. NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team. A review of 10 years of human microbiome research activities at the US national institutes of health, fiscal years 2007-2016. *Microbiome*, 2019, 7: 31 (doi: 10.1186/s40168-019-0620)
39. Peterson S.N., Snesrud E., Liu J., Ong A.C., Kilian M., Schork N.J., Bretz W. The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS ONE*, 2013, 8: e58487 (doi: 10.1371/journal.pone.0058487).
40. Yang F., Zeng X., Ning K., Liu K.L., Lo C.C., Wang W., Chen J., Wang D., Huang R., Chang X. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J.*, 2012, 6: 1-10 (doi: 10.1038/ismej.2011.71).
41. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353(18):1899-1911 (doi: 10.1056/NEJMoa043802).
42. Cotozzolo E., Cremonesi P., Curone G., Characterization of bacterial microbiota composition along the gastrointestinal tract in rabbits. *Animals (Basel)*, 2020, 11(1): 31 (doi: 10.3390/ani11010031).
43. Chen C., Song X., Wei W., Zhong H., Dai J., Lan Z., Li F., Yu X., Feng Q., Wang Z. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat. Commun.*, 2017, 8: 875 (doi: 10.1038/s41467-017-00901-0).
44. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E., Garcia R., Rendi M., Agnew K., Fredricks D.N., Eschenbach D. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, 212(5): 611.e1-611.e9 (doi: 10.1016/j.ajog.2014.11.043).
45. Hickey R.J., Zhou X., Pierson J.D., Ravel J., Forney L.J. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl. Res.*, 2012, 160(4): 267-282 (doi: 10.1016/j.trsl.2012.02.0080).
46. Noyes N., Cho K.-C., Ravel J., Forney L.J., Abdo Z. Associations between sexual habits, menstrual hygiene practices, demographics and the vaginal microbiome as revealed by Bayesian network analysis. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0191625 (doi: 10.1371/journal.pone.0191625).
47. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.K., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, 108(supplement_1): 4680- 4687 (doi: 10.1073/pnas.1002611107).
48. Gajer P., Brotman R.M., Bai G., Sakamoto J., Schütte U.M.E., Zhong X., Koenig S.S.K., Fu L., Ma Z.S., Zhou X., Abdo Z., Forney L.J., Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med.*, 2012, 4(132): 132ra152 (doi: 10.1126/scitranslmed.3003605).
49. Albert A.Y.K., Chaban B., Wagner E.C., Schellenberg J.J., Links M.G., Van Schalkwyk J., Reid G., Hemmingsen S.M., Hill J.E., Money D. A study of the vaginal microbiome in healthy Canadian women utilizing cpn60-based molecular profiling reveals distinct *Gardnerella* subgroup community state types. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0135620 (doi: 10.1371/journal.pone.0135620).
50. O'Hanlon D.E., Moench T.R., Cone R.A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when *Lactobacilli* dominate the microbiota. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80074 (doi: 10.1371/journal.pone.0080074).
51. Anahtar M.N., Byrne E.H., Doherty K.E., Bowman B.A., Yamamoto H.S., Soumillon M., Padavattan N., Ismail N., Moodley A., Sabatini M.E., Ghebremichael M.S., Nusbaum C., Huttenhower C., Virgin H.W., Ndung'u T., Dong K.L., Walker B.D., Fichorova R.N., Kwon D.S. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*, 2015, 42(5): 965-976 (doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.019).

52. Anukam K.C., Osazuwa E.O., Ahonkhai I., Reid G. Lactobacillus vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sexually Transmitted Diseases*, 2006, 33(1): 59-62 (doi: 10.1097/01.olq.0000175367.15559).
53. Pendharker S., Magopane T., Larsson P.-G., de Bruyn G., Gray G.E., Hammarstrum L., Marcotte H. Identification and characterisation of vaginal *Lactobacilli* from South African women. *BMC Infect. Dis.*, 2013, 13: 43 (doi: 10.1186/1471-2334-13-43).
54. MacIntyre D.A., Chandiramani M., Lee Y.S., Kindinger L., Smith A., Angelopoulos N., Lehne B., Arulkumaran S., Brown R., Teoh T.G., Holmes E., Nicholson J.K., Marchesi J.R., Bennett P.R. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 8988 (doi: 10.1038/srep08988).
55. Aagaard K., Riehle K., Ma J., Segata N., Mistretta T.A., Coarfa C., Raza S., Rosenbaum S., Van den Veyver I., Milosavljevic A. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS ONE*, 2012, 7: e36466 (doi: 10.1371/journal.pone.0036466).
56. Romero R., Hassan S.S., Gajer P., Tarca A.L., Fadrosch D.W., Nikita L., Galuppi M., Lamont R.F., Chaemsathong P., Miranda J., Chaiworapongsa T., Ravel J. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of nonpregnant women. *Microbiome*, 2014, 2: 4 (doi: 10.1186/2049-2618-2-4).
57. Hyman R.W., Fukushima M., Jiang H., Fung E., Rand L., Johnson B., Vo K.C., Caughey A.B., Hilton J.F., Davis R.W., Giudice L.C. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences*, 2014, 21(1): 32-40 (doi: 10.1177/1933719113488838).
58. Stout M.J., Zhou Y., Wylie K.M., Tarr P.I., Macones G.A., Tuuli M.G. Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2017, 217(3): 356.e1-356.e18 (doi: 10.1016/j.ajog.2017.05.030).
59. Mendes-Soares H., Suzuki H., Hickey R.J., Forney L.J. Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal *Lactobacilli* to their environment. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(7): 1458-1470 (doi: 10.1128/JB.01439-13).
60. Ojala T., Kankainen M., Castro J., Cerca N., Edelman S., Westerlund-Wikström B., Paulin L., Holm L., Auvinen P. Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1070 (doi: 10.1186/1471-2164-15-1070).
61. Graspentner S., Bohlmann M.K., Gillmann K., Speer R., Kuenzel S., Mark H., Hoellen F., Lettau R., Griesinger G., König I.R. Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0191047 (doi: 10.1371/journal.pone.0191047).
62. Babu G., Singaravelu B.G., Srikumar R., Reddy S.V. Comparative study on the vaginal flora and incidence of asymptomatic vaginosis among healthy women and in women with infertility problems of reproductive age. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2017, 11(8): DC18-DC22 (doi: 10.7860/JCDR/2017/28296.10417).
63. Campisciano G., Florian F., D'Eustacchio A., Stankovi D., Ricci G., De Seta F., Comar M. Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J. Cell. Physiol.*, 2017, 232(7): 1681-1688 (doi: 10.1002/jcp.25806).
64. Di M.P., Filardo S., Porpora M.G., Recine N., Latino M.A., Sessa R. HPV/Chlamydia trachomatis co-infection: metagenomic analysis of cervical microbiota in asymptomatic women. *New Microbiologica*, 2018, 41(1): 34-41.
65. Van de Wijgert J.H.H.M., Borgdorff H., Verhelst R., Crucitti T., Francis S., Verstraelen H., Jaspers V. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS ONE*, 2014, 9: e105998 (doi: 10.1371/journal.pone.0105998).
66. Workowski K.A., Bolan G.A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *Recommendations and Reports*, 2015, 64(RR3): 1-137.
67. Onderdonk A.B., Delaney M.L., Fichorova R.N. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2016, 29(2): 223-238 (doi: 10.1128/CMR.00075-15).
68. Gottschick C., Deng Z.-L., Vital M., Masur C., Abels C., Pieper D.H., Wagner-Döbler I. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*, 2017, 5: 99 (doi: 10.1186/s40168-017-0305-3).
69. Donders G.G., Van Calsteren K., Bellen G., Reybrouck R., Van den Bosch T., Riphagen I., Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2009, 116(10): 1315-1324 (doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02237.x).
70. Işık G., Demirezen Ş., Dönmez H.G., Beksaç M.S. Bacterial vaginosis in association with spontaneous abortion and recurrent pregnancy losses. *Journal of Cytology*, 2016, 33(3): 135-140 (doi: 10.4103/0970-9371.188050).
71. Karstrup C.C., Klitgaard K., Jensen T.K., Agerholm J.S., Pedersen H.G. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology*, 2017, 99: 41-47 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.013).
72. Bicalho M.L., Lima F.S., Machado V.S., Meira E.B. Jr., Ganda E.K., Foditsch C., Bicalho R.C., Gilbert R.O. Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis, and pregnancy

- outcomes in dairy cows. *Theriogenology*, 2016, 85(2): 267-274 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.043).
73. Galvão K.N., Bicalho R.C., Jeon S.J. Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(12): 11786-11797 (doi: 10.3168/jds.2019-17106).
 74. Bicalho V.S., Machado C.H., Higgins F.S., Lima R.C. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(5): 3850-3862 (doi: 10.3168/jds.2016-12058).
 75. Bicalho M.L.S., Lima S., Higgins C.H., Machado V.S., Lima F.S., Bicalho R.C. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part II: Purulent vaginal discharge versus healthy cows. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(5): 3863-3874 (doi: 10.3168/jds.2016-12061).
 76. Umar T., Yin B., Umer S., Ma X., Jiang K., Umar Z., Akhtar M., Shaikat A., Deng G. MicroRNA: could it play a role in bovine endometritis? *Inflammation*, 2021, 44(5): 1683-1695 (doi: 10.1007/s10753-021-01458-3).
 77. Miller E.A., Beasley D.E., Dunn R.R., Archie E.A. Lactobacilli dominance and vaginal pH: why is the human vaginal microbiome unique? *Front. Microbiol.*, 2016, 7: 1936 (doi: 10.3389/fmicb.2016.01936).
 78. Swartz J.D., Lachman M., Westveer K., O'Neill T., Geary T., Kott R.W., Berardinelli J.G., Hatfield P.G., Thomson J.M., Roberts A., Yeoman C.J. Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 2014, 1: 19 (doi: 10.3389/fvets.2014.00019).
 79. Hyman R.W., Herndon C.N., Jiang H., Palm C., Fukushima M., Bernstein D., Vo K.C., Zelenko Z., Davis R.W., Giudice L.C. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2012, 29(2): 105-115 (doi: 10.1007/s10815-011-9694-6).
 80. Moore D.E., Soules M.R., Klein N.A., Fujimoto V.Y., Agnew K.J., Eschenbach D.A. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 2000, 74(6): 1118-1124 (doi: 10.1016/s0015-0282(00)01624-1).
 81. Hillier S.L., Nugent R.P., Eschenbach D.A., Krohn M.A., Gibbs R.S., Martin D.H., Cotch M.F., Edelman R., Pastorek J.G., Rao A.V., McNellis D., Regan J.A., et al., for the Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *New England Journal of Medicine*, 1995, 333: 1737-1742 (doi: 10.1056/NEJM199512283332604).
 82. Haahr T., Jensen J.S., Thomsen L., Duus L., Rygaard K., Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Human Reproduction*, 2016, 31(4): 795-803 (doi: 10.1093/humrep/dew026).
 83. Mangot-Bertrand J., Fenollar F., Bretelle F., Gamerre M., Raoult D., Courbiere B. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: impact on IVF outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2013, 32: 535-541 (doi: 10.1007/s10096-012-1770-z).
 84. Pelzer E.S., Allan J.A., Waterhouse M.A., Ross T., Beagley K.W., Knox C.L. Microorganisms within human follicular fluid: effects on IVF. *PLoS ONE*, 2013, 8: e59062 (doi: 10.1371/journal.pone.0059062).
 85. Petrova M., Lievens E., Malik S., Imholz N., Lebeer S. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 81 (doi: 10.3389/fphys.2015.00081).
 86. Moreno I., Codocero F.M., Vilella F., Valbuena D., Martinez-Blanch J.F., Jimenez-Almazán J., Alonso R., Alamá P., Remohí J., Pellicer A. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2016, 215: 684-703 (doi: 10.1016/j.ajog.2016.09.075).
 87. Cicinelli E., Matteo M., Tinelli R., Lepera A., Alfonso R., Indraccolo U., Marrocchella S., Greco P., Resta L. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Human Reproduction*, 2015, 30(2): 323-330 (doi: 10.1093/humrep/deu292).
 88. Cicinelli E., Matteo M., Tinelli R., Pinto V., Marinaccio M., Indraccolo U., De Ziegler D., Resta L. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reproductive Sciences*, 2014, 21(5): 640-647 (doi: 10.1177/1933719113508817).
 89. Khan K.N., Fujishita A., Kitajima M., Hiraki K., Nakashima M., Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. *Human Reproduction*, 2014, 29(11): 2446-2456 (doi: 10.1093/humrep/deu222).
 90. Fotouh I.A., Al-Inany M.G. The levels of bacterial contamination of the embryo transfer catheter relate negatively to the outcome of embryo transfer. *Middle East Fertility Society Journal*, 2008, 13(1): 39-43.
 91. Franasiak J.M., Werner M.D., Juneau C.R., Tao X., Landis J., Zhan Y., Treff N.R., Scott R.T. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2016, 33(1): 129-136 (doi: 10.1007/s10815-015-0694-6).

10.1007/s10815-015-0614-z).

92. Kroon B., Hart R.J., Wong B., Ford E., Yazdani A. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012, 3: CD008995 (doi: 10.1002/14651858.CD008995.pub2).
93. Brook N., Khalaf Y., Coomarasamy A., Edgeworth J., Braude P. A randomized controlled trial of prophylactic antibiotics (co-amoxiclav) prior to embryo transfer. *Human Reproduction*, 2006, 21(11): 2911-2915 (doi: 10.1093/humrep/del263).
94. Schoenmakers S., Steegers-Theunissen R., Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstetric Medicine*, 2019, 12(3): 107-115 (doi: 10.1177/1753495X18775899).
95. Kim J.H., Yoo S.M., Sohn Y.H., Jin C.H., Yang Y.S., Hwang I.T., Oh K.Y. Predominant *Lactobacillus* species types of vaginal microbiota in pregnant Korean women: quantification of the five *Lactobacillus* species and two anaerobes. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2017, 30(19): 2329-2333 (doi: 10.1080/14767058.2016.1247799).
96. Beckers K.F., Sones J.L. Maternal microbiome and the hypertensive disorder of pregnancy, preeclampsia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2020, 318(1): H1-H10 (doi: 10.1152/ajpheart.00469.2019).
97. McElrath T.F., Hecht J.L., Dammann O., Boggess K., Onderdonk A., Markenson G., Harper M., Delpapa E., Allred E.N., Leviton A., ELGAN Study Investigators. Pregnancy disorders that lead to delivery before the 28th week of gestation: an epidemiologic approach to classification. *American Journal of Epidemiology*, 2008, 168(9): 980-989 (doi: 10.1093/aje/kwn202).
98. Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.*, 2014, 6(237): 237ra65 (doi: 10.1126/scitranslmed.3008599).
99. Benner M., Ferwerda G., Joosten L., Van der Molen R.G. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction*, 2018, 24(4): 393-415 (doi: 10.1093/humupd/dmy012).
100. Weng S.-L., Chiu C.-M., Lin F.-M., Huang W.-C., Liang C., Yang T., Yang T.-L., Liu C.-Y., Wu W.-Y., Chang Y.-A., Chang T.-H., Huang H.-D. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110152 (doi: 10.1371/journal.pone.0110152).
101. Gdoura R., Kchaou W., Chaari C., Znazen A., Keskes L., Rebai T., Hammami A. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis.*, 2007, 7: 129 (doi: 10.1186/1471-2334-7-129).
102. Zinzendorf N.Y., Kouassi-Agnessi B.T., Lathro J.S., Don C., Kouadio L., Loukou Y.G. *Ureaplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* infections and semen quality of infertile men in Abidjan. *Journal of Reproduction and Contraception*, 2008, 19(2): 65-72 (doi: 10.1016/S1001-7844(08)60008-5).
103. Ahmadi M.H., Mirsalehian A., Gilani M.A.S., Bahador A., Talebi M. Asymptomatic infection with *Mycoplasma hominis* negatively affects semen parameters and leads to male infertility as confirmed by improved semen parameters after antibiotic treatment. *Urology*, 2017, 100: 97-102 (doi: 10.1016/j.urology.2016.11.018).
104. Mändar R., Punab M., Korrovits P., Türk S., Ausmees K., Lapp E., Preem J.K., Oopkaup K., Salumets A., Truu J. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int. J. Urol.*, 2017, 24(3): 211-216 (doi: 10.1111/iju.13286).
105. Monteiro C., Marques P.I., Cavadas B., Damiro I., Almeida V., Barros N., Barros A., Carvalho F., Gomes S., Seixas S. Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, 79(6): e12838 (doi: 10.1111/aji.12838).
106. Marco-Jiménez F., Borrás S., García-Domínguez X., D'Auria G., Vicente J.S., Marin C. Roles of host genetics and sperm microbiota in reproductive success in healthy rabbit *Theriogenology*, 2020, 158: 416-423 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.09.028).
107. Mändar R., Punab M., Borovkova N., Lapp E., Kiiker R., Korrovits P., Metspalu A., Krjutškov K., Nölvak H., Preem J.K., Oopkaup K., Salumets A., Truu J. Complementary semiovaginal microbiome in couples. *Research in Microbiology*, 2015, 166(5): 440-447 (doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.009).
108. Borovkova N., Korrovits P., Ausmees K., Turk S., Joers K., Punab M., Mändar R. Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe*, 2011, 17(6): 414-418 (doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.04.015).
109. Eschenbach D.A., Patton D.L., Hooton T.M., Meier A.S., Stapleton A., Aura J., Agnew K. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(6): 913-918 (doi: 10.1086/319251).
110. Leppaluoto P.A. Bacterial vaginosis: what is physiological in vaginal bacteriology? An update and opinion. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 2011, 90(12): 1302-1306 (doi: 10.1111/j.1600-0412.2011.01279.x).
111. Robertson S.A., Sharkey D.J. Seminal fluid and fertility in women. *Fertility and Sterility*, 2016, 106(3): 511-519 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1101).