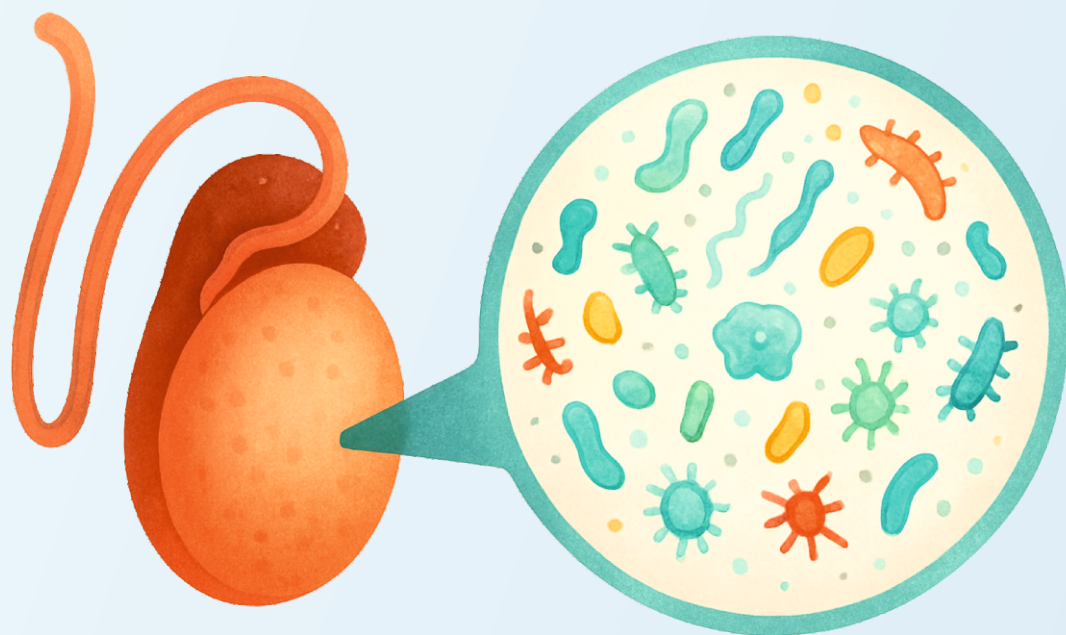


**М. В. Фаниев
З. А. Кадыров**

ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ МИКРОБИОМ



ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ МИКРОБИОМ

Монография

Электронное текстовое издание

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2026

© Авторский коллектив, 2026
ISBN 978-5-00271-046-1

УДК 616.6
ББК 56.9
Т36

Рецензенты:

Халид Сулейманович Ибишев — доктор медицинских наук, профессор кафедры урологии и репродуктивного здоровья человека (с курсом детской урологии-андрологии) РостГМУ Минздрава России, член правления Ассоциации специалистов консервативной терапии в урологии «АСПЕКТ»;

Роман Вячеславович Салюков — доктор медицинских наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, доцент кафедры медицинской реабилитации ФДПО ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фаниев, М. В.

Т36 Тестикулярный микробиом [Электронный ресурс]: монография / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Н. Г. Кульченко, Д. И. Водолажский, В. С. Степанов. — СПб.: Научное издание, 2026. — 180 с. — URL: <https://publishing.intelgr.com/archive/Testikulyarnii-mikrobiom.pdf>.

ISBN 978-5-00271-046-1

Современная андрология переживает кардинальный пересмотр взглядов, связанный с осознанием фундаментальной роли микробиома в регуляции мужской репродуктивной функции. Представленная монография посвящена одному из наиболее дискуссионных и динамично развивающихся направлений — исследованию тестикулярного микробиома и его влияния на фертильность. Долгое время стерильность паренхимы яичка считалась аксиомой, однако развитие высокоточных методов молекулярной диагностики опровергло эту догму, открыв новое измерение в понимании физиологии и патологии сперматогенеза.

Особое внимание в работе уделяется роли микробных сообществ в патогенезе идиопатической азооспермии — наиболее тяжелой формы мужского бесплодия, при которой традиционные диагностические алгоритмы часто не позволяют установить этиологию. Новейшие данные свидетельствуют, что дисбиоз тестикулярной микробиоты может выступать триггером каскада патологических процессов, ведущих к нарушению сперматогенеза. Одним из ключевых механизмов является опосредованная микробиомом дестабилизация гематотестикулярного барьера — высокоспециализированной структуры, обеспечивающей иммунную привилегию герминативного эпителия.

Активация тучных клеток и выделение ими провоспалительных медиаторов (гистамина, триптазы, IL-6) приводит к повышению проницаемости гематотестикулярного барьера, запуская тем самым аутоиммунные реакции против развивающихся половых клеток и усугубляя повреждение сперматогенного эпителия.

Особую ценность представляет синтез современных данных о взаимосвязи между кишечным, уретральным и тестикулярным микробиомами, формирующими единую экосистему, нарушения в которой могут иметь системные последствия для репродуктивного здоровья.

Монография адресована андрологам, урологам, репродуктологам и исследователям, заинтересованным в углубленном понимании молекулярных основ мужского бесплодия. Авторы надеются, что представленные материалы послужат импульсом для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий, направленных на коррекцию микробных нарушений как перспективного направления прецизионной андрологии.

ISBN 978-5-00271-046-1

© Авторский коллектив, 2026

Научное издание

Фаниев Михаил Владимирович
Кадыров Зиёратшо Абдуллоевич
Кульченко Нина Геннадьевна
Водолажский Дмитрий Игоревич
Степанов Владимир Сергеевич

Тестикулярный микробиом

Монография

Электронное текстовое издание

Редактор Я. А. Веретнова
Корректор Я. А. Веретнова
Верстка Ю. Н. Сафонкина

Подписано к использованию 01.01.2026.
Объем издания — 8,1 Мб.

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
<https://publishing.intelgr.com>
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63
Интернет-магазин издательства
<https://shop.intelgr.com/>

ISBN 978-5-00271-046-1



9 785002 710461 >

Авторский коллектив

Михаил Владимирович Фаниев — кандидат медицинских наук, доцент кафедры эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Зиёратио Абдуллоевич Кадыров — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Нина Геннадьевна Кульченко — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы; преподаватель кафедры анатомии человека Медицинского института ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Дмитрий Игоревич Водолажский — кандидат биологических наук, руководитель лаборатории клеточных технологий, Центральная научно-исследовательская лаборатория медицинской академии имени С. И. Георгиевского при Крымском федеральном университете имени В. И. Вернадского.

Владимир Сергеевич Степанов — ассистент кафедры эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, руководитель урологической службы «СМ-Клиника».

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	7
ЧАСТЬ I. ОБЩИЕ ДАННЫЕ О МИКРОБИОМЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ	10
1. Введение	10
2. Терминология	13
3. Общая патология и микробиом	19
4. Онкологические заболевания и микробиом	23
5. Роль этнической принадлежности в вариациях микробиома	29
6. Микробиом уrogenитального тракта	35
7. Тестикулярный микробиом у infертильных мужчин	45
7.1. Вступление	45
7.2. Изучение популяции мужчин с азооспермией	47
7.3. Обсуждение	49
8. Микробиом яичка у мужчин с азооспермией — первые свидетельства воздействия измененной микросреды	51
8.1. Вступление	51
8.2. Состав и разнообразие бактериальных сообществ в группах контроля, ОА и НОА	53
8.3. Обсуждение	55
9. Разнообразие таксономической структуры микробиома семенной жидкости у пациентов с различными видами азооспермии	56
9.1. Вступление	56
9.2. Состав и таксономическое разнообразие бактериальных сообществ в группах сравнения пациентов с азооспермией	57
9.3. Обсуждение	59
ЧАСТЬ II. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТЕСТИКУЛЯРНОГО МИКРОБИОМА	62
Глава 10. Первый российский опыт исследования микробиома тестикул методом высокопроизводительного секвенирования NGS	62
10.1. Введение и актуальность	62
10.2. Материалы и методы	65
10.3. Результаты	65
10.4. Обсуждение и выводы	71

Глава 11. Структура микробиоты фертильных и инфертильных пациентов с различными видами азооспермии	74
11.1. Введение и актуальность	74
11.2. Материалы и методы.....	76
11.3. Результаты	78
11.4. Обсуждение и выводы.....	86
Глава 12. Сравнительная характеристика структуры микробиоты тестикул и уретры у пациентов с различными видами азооспермией и пациентов и сопутствующим варикоцеле	89
12.1. Введение и актуальность	89
12.2. Материалы и методы.....	99
12.3. Результаты	103
12.4. Обсуждение и выводы.....	112
Глава 13. Характеристика структуры тестикулярной микробиоты и уретры у мужчин с необструктивной азооспермией с различными исходами в протоколах ВРТ	116
13.1. Введение и актуальность	116
13.2. Материалы и методы.....	120
13.3. Результаты	122
13.4. Обсуждение и выводы.....	126
Глава 14. Взаимодействие между микробиомом и мастоцитами тестикулярной ткани при мужской инфертильности	134
14.1. Введение и актуальность	134
14.2. Материалы и методы.....	139
14.3. Результаты	142
14.4. Обсуждение и выводы.....	148
Глава 15. Тучные клетки в сочетании с обеднением микробиома яичка как фактор необструктивного мужского бесплодия	152
15.1. Введение и актуальность	152
15.2. Клиническое наблюдение	155
15.3. Результаты	156
15.4. Обсуждение и выводы.....	160
Заключение	166
Список литературы.....	168

Список сокращений

ААУ — Американская ассоциация урологов
АЛСП — артерия левого семявыносящего протока
АМП — аорто-мезентериальный пинцет
АОРМ (ASMR) — Американское общество репродуктивной медицины
АПСП — артерия правого семявыносящего протока
АС — антиоксиданты
АФК — активные формы кислорода
БТШ — белки теплового шока
ВГС — вены гроздевидного сплетения
ВЗК — воспалительные заболевания кишечника
ВМИ — внутриматочная инсеминация
ВС — восстановительный стресс
ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии
ВЭ — варикоцелэктомия
ГАМП — гиперактивный мочевой пузырь
ГТБ — гематотестикулярный барьер
ДВ — двустороннее варикоцеле
ДИ — доверительный интервал
ДЭБ — дифференциально экспрессированные белки
ЕАУ — Европейская ассоциация урологов
ИКСИ — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов
ИНА — идиопатическая необструктивная азооспермия
ИТВ — интратестикулярное варикоцеле
ЛВСВ — левая внутренняя семенная вена
ЛГ — лютеинизирующий гормон
ЛНВ — левая надпочечниковая вена
ЛПА — левая почечная артерия
ЛПВ — левая почечная вена
ЛСВ — левая семенная вена
МВ — микрохирургическая варикоцелэктомия
НОА — необструктивная азооспермия
НПВ — нижняя полая вена
ОА — обструктивная азооспермия
ОАТ — олигоастенотератозооспермия
ОКС — общая концентрация сперматозоидов
ОС — оксидативный стресс
ОШ — отношение шансов
ППА — правая почечная артерия
ППВ — правая почечная вена
РКА — ренокавальный анастомоз
РКИ — рандомизированное контролируемое исследование
РФК — реактивные формы кислорода

СВ — субклиническое варикоцеле
 СНМП — синдром нижних мочевыводящих путей
 СХТБ — синдром хронической тазовой боли
 СОТ — средний объем тромбоцитов
 ТС — тестостерон
 ФДС — фрагментация ДНК сперматозоидов
 ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
 ФТ — фекальная трансплантация
 УЗИ — ультразвуковое исследование
 УЗДГ — ультразвуковая доплерография
 ХП — хронический простатит
 СХТБ — синдром хронической тазовой боли
 ЦДК — цветное доплеровское картирование
 ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение
 ЭСВ — эластосонография сдвиговой (поперечной) волны
 ИЛ-8 — интерлейкин-8
 ИЛ-1 β — интерлейкин-1 β
 АТМ — серин/треониновая протеинкиназа (от англ. Ataxia teleangiectasia mutated)
 АТР — серин/треониновая протеинкиназа (от англ. Ataxia teleangiectasia and Rad3 related)
 BRAF — цитозольная серин/треониновая протеинкиназа, протоонкоген (от англ. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)
 CPSI — индекс симптомов хронического простатита (от англ. Chronic Prostatitis Symptom Index)
 HIF-1 α — фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа (от англ. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
 HMP — проект «Микробиом человека» («The Human Microbiome Project»)
 HPG-ось — гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось (от англ. hypothalamic-pituitary-gonadal axis)
 LC — жидкостная хроматография (от англ. Liquid chromatography)
 Micro TESE — микроскопическая биопсия яичка (от англ. Testicular Sperm Extration)
 МС — масс-спектрометрия
 NADH — никотинамид-аденин-динуклеотид
 NAG — нейтральная α -глюкозидаза
 NER — однонуклеотидная эксцизионная репарация (от англ. Nucleotide Excision Repair)
 НК — натуральные киллеры, естественные киллеры (от англ. natural killer cells)
 NLRP3 — цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP (от англ. NOD-like receptor family pyrin domain containing 3)
 NLRP6 — цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP (от англ. NOD-like receptor family pyrin domain containing 6)
 NLRP12 — цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP (от англ. NOD-like receptor family pyrin domain containing 12)
 MYC — онкоген (от англ. V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)
 OTU — операционная таксономическая единица (Operational Taxonomic Unit)
 PDRN — полидезоксирибонуклеотид
 PTEN — ген-супрессор опухолевого роста (англ. Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10)

RAD17-RFC — пентамерный белковый комплекс, связанный с фактором репликации (RAD17-репликационный фактор C)

RAS — онкогены, последовательности ДНК, ассоциированные с ретровирусом (англ. Retrovirus Associated DNA Sequences)

RB1 — ген-супрессор опухолевого роста (от англ. retinoblastoma protein)

TESA — чрескожная биопсия яичка (от англ. Testicular Sperm Aspiration)

TNF- α — фактор некроза опухоли-альфа (от англ. Tumor necrosis factor)

TP53 — ген-супрессор опухолевого роста (от англ. Tumor protein p53)

VEG — фактор роста эндотелия сосудов (от англ. Vascular endothelial growth factor)

Часть I. Общие данные о микробиоме репродуктивной системы

1. Введение

Сообщество микробов, населяющих организм человека, всегда привлекало внимание ученых, но несмотря на древность медицины, сделавшей первые шаги еще на заре человеческой цивилизации, к их серьезному и глубокому изучению наука подошла относительно недавно.

Термин «микробиом», который сегодня известен каждому врачу и уверенно занял место в научном лексиконе, ввел в 2000 году нобелевский лауреат, американский генетик и биохимик Джошуа Ледерберг для обозначения коллективных геномов.

Первые попытки изучения, сформировавшие впоследствии основную концепцию и выявившие важность его исследования, берут начало с конца XIX века. На заре становления экологической микробиологии, российский ученый Сергей Николаевич Виноградский заложил основы нового научного направления — экологии микроорганизмов. Его работы сыграли ключевую роль в понимании роли микробов в экосистемах, их взаимодействии с окружающей средой и другими организмами. Основы учения Виноградского включали в себя следующие аспекты:

— микроорганизмы не просто обитают в среде, но активно участвуют в биогеохимических циклах, играя важнейшую роль в процессах, таких как минерализация, питание растений и поддержание плодородия почвы. Он описал физиологические особенности различных микробов и их способности к ассимиляции различных форм углерода и азота;

— исследование микроорганизмов в специфических экосистемах, таких как водоемы, почвы и даже в самых экстремальных условиях, дает наиболее реальное представление о видовом разнообразии и экспансии микробов в разных биотопах;

— разработка методов исследования: изоляция чистых культур микробов, что дало возможность детально изучать их физиологические и экологические свойства;

— опыт с серобактериями: одним из значимых открытий Виноградского стало изучение серобактерий, которые он обнаружил в 1887 году на дне грязных

водоемов, показали, как эти организмы участвуют в цикле серы, и объясняют их значение для питания и метаболизма высших организмов.

Научные идеи Виноградского положили начало комплексной оценке экологических аспектов микробиологии, что имеет актуальное значение для современных исследований в области экологии, сельского хозяйства и медицины. Впервые были классифицированы почвенные микроорганизмы на автохтонные (типичные) и аллохтонные (зимогенные), что оказалось применимым для большинства экосистем. В 1949 году вышла его книга «Микробиология почвы, проблемы и методы» на французском языке, а в 1952 году был издан ее русский перевод. Свою последнюю научную работу Виноградский посвятил систематике бактерий. Его работы служат основой для дальнейших исследований в области взаимодействий между отдельными микробами и более сложными экосистемами, включая микробные сообщества в кишечнике человека, а также изучения их влияния на здоровье.

С. Н. Виноградский не только расширил горизонты микробиологии, но и способствовал признанию экологии микроорганизмов как важного аспекта в науках о жизни и создал новое научное направление — «экология микроорганизмов»¹.

Современное понимание микробиома охватывает все виды микробиоты, присутствующие в организме человека, которые обитают в различных тканях и биологических жидкостях. Микробиом представляет собой сложное и многосоставное сообщество микроорганизмов, находящееся в специфических анатомических локациях, где они осуществляют свою жизнедеятельность и взаимодействуют с макроорганизмом. Эти микробные сообщества встречаются во всех функциональных системах и органах организма, включая дерму, молочные железы, плацентарные ткани, семенную жидкость, эндометрий, фолликулы яичников, а также в дыхательной системе, включая легкие, слюну и слизистые оболочки полости рта. Кроме того, микробиота обосновывается в конъюнктиве, желчевыводящих путях, желудочно-кишечном тракте и урогенитальной системе. Наш микробиом многогранен, разнообразен и содержит бактерии, археи, грибы, протисты и вирусы.

В молекулярной биологии термин «микробиом человека» часто используется для обозначения совокупности геномов резидентных микроорганизмов, обитающих в человеческом организме. Этот термин охватывает не только сами микроорганизмы, такие как бактерии, археи, грибы и вирусы, но также включает в себя их генетическую информацию, которая выполняет множество

¹ Рассказы о великом бактериологе С. Н. Виноградском / Сост.: Ю. А. Мазинг, Т. В. Андриюшкевич, Ю. П. Голиков; Пер. С. Борисова под ред. Ю. А. Мазинга. — СПб. Росток, 2002. — 320 с. — (Фундаментальная наука). — 1000 экз. — ISBN 5-94668-008-0.

функций, играя ключевую роль в поддержании здоровья хозяина. Согласно работе Sherwood, Willey и Woolverton (2013) в книге „Prescott's Microbiology“, микробиом человека представляет собой сложную и динамичную экосистему, состоящую из триллионов микробов, которые колонизируют различные биотопы в организме².

Вместе с тем следует отметить, что термин «метагеном человека» используется для обозначения совокупности генетической информации, полученной от всех микроорганизмов, обитающих в человеческом организме, включая бактерии, археи, грибы и вирусы. Согласно статье Marchesi и Ravel (2015) „The vocabulary of microbiome research: a proposal“, метагеном представляет собой важный аспект изучения микробиома, так как он включает в себя не только отдельные геномы, но и их функциональные составляющие.

В рамках метагенома человека рассматриваются миллиарды микробных генов, которые образуют обширную и разнообразную экосистему, обитающую на различных участках тела. Микробы взаимодействуют между собой и с макроорганизмом, оказывая влияние на физиологические процессы, метаболизм, иммунные реакции и здоровье человека в целом. Для анализа метагенома применяются передовые методы секвенирования, которые позволяют исследовать не только наличие микробов, но и их гены, влияющие на различные метаболические пути и функциональные возможности. Это открывает новые горизонты для понимания их роли в здоровье и патогенезе различных заболеваний. Важность метагенома заключается в том, что микробные сообщества могут вырабатывать метаболиты, регулирующие метаболические процессы и оказывающие влияние на иммунный ответ хозяина. Понимание метагеномного контекста позволяет разработать более эффективные подходы к лечению заболеваний, связанных с нарушением микробиоты. Исследование метагенома открывает возможности для применения пробиотиков, пребиотиков и других модулей микробиоты с целью восстановления нормальной флоры, а также может способствовать созданию индивидуализированных терапевтических стратегий, основанных на уникальном составе метагенома конкретного человека.

Таким образом, термин «метагеном человека» охватывает комплексную картину взаимодействий между различными микроорганизмами и хозяином, а также их значимость для здоровья, что делает его центральным понятием в области исследований микробиома³.

² Sherwood Linda; Willey Joanne; Woolverton Christopher (2013). Prescott's Microbiology (9th ed.). New York: McGraw Hill. pp. 713–721. ISBN 9780073402406. OCLC 886600661.

³ Marchesi J. R., Ravel J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome. 3: 31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5.

2. Терминология

Говоря о колонии бактерий, мы, как правило, подразумеваем скопление микроорганизмов, проживающих в едином пространстве. Вместе с тем последние исследования «поведенческих реакций» представителей микромира, наглядно показывают, что человеческий социум не особенно отличается от них по ряду признаков.

Исследование, проведенное группой ученых из Пенсильванского университета под руководством Хена Ку, изучило механизмы формирования колоний у отдельных видов бактерий, закономерности и динамику роста колоний микробов, аналогичное нашему собственному поведению в городской среде⁴.

Сегодня можно уверенно заявить, что каждый из нас является носителем и питательной средой для множества колоний микроорганизмов. По традиционной, принятой во всем мире оценке считается, что среднестатистический человеческий организм несет в себе втрое больше клеток, отличных от клеток самого человека⁵.

Однако нужно помнить, что все колонии ведут себя равнозначно по отношению к человеческому организму, который, по сути, является их домом.

Живущие в нас колонии микроорганизмов можно условно разделить на две большие, безвредные для человека группы: комменсальные и мутуалистические микроорганизмы. Комменсальные микроорганизмы представляют собой виды, которые обитают в человеческом организме, не нанося ему вреда. Они поддерживают стабильные симбиотические отношения, из которых обе стороны извлекают выгоду: микроорганизмы получают места обитания и питательные вещества, в то время как организм использует их метаболические продукты для поддержания здоровья. Эти бактерии могут играть важную роль в защите хозяина от патогенных микробов, участвуя в процессе колонизации, конкурируя за ресурсы и производя антимикробные вещества. Примерами таких бактерий могут служить различные виды кишечных микробов, которые способствуют перевариванию пищи и синтезу витаминов. Мутуалистические

⁴ Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization: Amauri J. Paula, Geelsu Hwang, Hyun Koo, Nat.com, march 2020 г.; 11 (1): 1354. doi: 10.1038/s41467-020-15165-4.

⁵ Sender R., Fuchs S., Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. Cell. 2016; 164 (3): 337-40. PMID: 26824647. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

микроорганизмы, в отличие от комменсальных, находятся в более тесном взаимодействии с организмом хозяина, и их существование зависит от этого симбиоза. Эти микроорганизмы обеспечивают человека жизненно важными функциями, которые невозможно осуществить без их участия. Например, некоторые виды кишечных бактерий участвуют в расщеплении сложных углеводов и синтезе витаминов группы В и витамина К, которые необходимы для нормальной функции организма. Кроме того, они стимулируют иммунный ответ, обеспечивая защиту от инфекций и способствуя поддержанию баланса микроэкологии. Мутуалисты становятся неотъемлемой частью экосистемы организма, и негативные изменения в их популяциях могут привести к различным нарушениям или заболеваниям.

Ряд микроорганизмов, добросовестно состоящих на службе у своего хозяина, успешно решают задачи, полезные и необходимые для человека, но роль большинства из них до конца не изучена. В свою очередь, те микроорганизмы, которые сосуществуют в симбиотических отношениях и активно участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, жизнедеятельность которых зависит от этих процессов и которые не вызывают патологии, условно классифицируются как нормальная флора или нормальная микробиота⁶.

Вместе с тем ряд некоторых непатогенных микроорганизмов может вредить своим хозяевам, то есть нам, через производимые метаболиты. В качестве примера можно привести триметиламин, превращаемый человеческим организмом в N-оксид триметиламина через FMO3 опосредованное окисление⁷.

Одна из ключевых задач современной молекулярной биологии и генетики заключается в комплексном исследовании генома человека и его микробиома. Это включает в себя не только секвенирование человеческого генома, но и детальную характеристику бактериальной таксономической структуры микробиоты, обитающей на кожных покровах, в пищеварительном и урогенитальном тракте.

Для решения данной задачи и понимания взаимодействия между человеческим организмом и его микробиомом, был запущен международный проект The Human Microbiome Project (HMP), который представил собой многогранную научную инициированную программу, цель которой состояла в исследовании микробиоты человека и ее взаимосвязи с состоянием здоровья. В реали-

⁶ Quigley E. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol* (NY). 9 (9): 560-9. PMC 3983973. PMID 24729765.

⁷ Falony G., Vieira-Silva S., Raes J. (2015). Microbiology Meets Big Data: The Case of Gut Microbiota-Derived Trimethylamine. *Annu. Rev. Microbiol.* 69: 305–321. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104422.

зации этого проекта участвовали исследовательские организации из различных стран, каждая из которых применяла собственные научные разработки и внесла свой уникальный вклад.

1. США (National Institutes of Health, NIH). Ведущая роль в проекте принадлежит NIH, который инициировал HMP в 2007 году. Исследования в рамках HMP в США сосредоточены на секвенировании и анализе геномов микроорганизмов, обитающих в различных участках тела человека, таких как кишечник, кожа, рот и вагинальная область. Ученые разработали методы метагеномного секвенирования, позволяющие идентифицировать и каталогизировать виды микроорганизмов, а также их метаболические функции. Также акцент делается на изучении взаимодействия между микробиотой и генетикой хозяина.

2. Австралия (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, CSIRO). В Австралии исследовательская группа CSIRO занимается анализом микробиома человека с акцентом на его влияние на здоровье и болезни, включая метаболические расстройства, аллергии и аутоиммунные заболевания. Основные разработки включают анализ образцов микробиоты с использованием современных платформ секвенирования и методов биоинформатики для понимания функции микробиоты и ее взаимосвязи с диетой и образом жизни.

3. Канада (Canadian Institutes of Health Research, CIHR). Канадские ученые активно участвуют в HMP, сосредотачиваясь на исследованиях влияния микробиоты на заболевания и здоровье населения. CIHR разрабатывает стандартизацию методик сбора и анализа образцов, что позволяет сравнивать данные между различными группами и странами. Кроме того, исследуются взаимосвязи между микробиотой и иммунной системой, а также влияние конкретных диетических привычек на состав микрофлоры.

4. Китай (Ministry of Science and Technology, MOST). Участие Китая в HMP включает обширные исследования микробиома на фоне традиционной китайской медицины и диеты. Численные исследования фокусируются на микробиоте кишечника и ее взаимосвязи с метаболическими заболеваниями и пищеварительными расстройствами. Разработка методов для сбора и анализа образцов также является важным направлением, с акцентом на специфические местные патогены и их способности взаимодействовать с человеческим организмом.

5. Страны Европейского союза (MetaHIT Consortium). В рамках проекта MetaHIT, который является частью HMP, ученые из стран Европейского союза занимаются изучением микробиома кишечника и его роли в различных заболеваниях, таких как ожирение, воспалительные заболевания кишечника и диа-

бет. Работа ведется в сотрудничестве с крупными университетами и исследовательскими центрами, направленная на создание обширной базы данных о человеческом микробиоме, которая поможет исследователям по всему миру.

Задачей первой фазы проекта, запущенной в 2007 году, было определение характеристики микрофлоры человека и определение взаимосвязи с состоянием здоровья. Этот этап проекта сосредоточился на микробиоте, обитающей на различных участках тела, включая кишечник, кожу, рот, влагалище и другие системы, с целью получения более полного представления о роли микробиоты в организме.

Суть первой фазы:

1. Сбор образцов. Основной задачей было собрать образцы микробиоты у здоровых людей из разных групп населения. Исследователи собирали образцы с различных анатомических участков тела для дальнейшего анализа.

2. Метагеномное секвенирование. Применялся передовой метод секвенирования, позволяющий анализировать ДНК микроорганизмов в образцах. Этот подход обеспечивал получение информации о генетической последовательности множества видов микроорганизмов, которые обитают в организме человека.

3. Анализ данных. После сбора образцов и их секвенирования производился анализ полученных данных с использованием методов биоинформатики. Это позволило исследователям классифицировать различные виды микроорганизмов и оценить их относительное количество на разных участках тела.

Были получены следующие результаты:

— Создание библиотеки микробиома. В результате первой фазы была создана обширная библиотека данных о микробиоте человека, включающая в себя характеристики различных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и вирусы.

— Определение составов микробиоты. Исследования показали, что в микробиоме человека присутствует огромное разнообразие микроорганизмов, и состав микрофлоры варьируется в зависимости от анатомической области и индивидуальных факторов (например, генетика, возраст, пол и образ жизни).

— Выявление микробиомных ассоциаций. Первая фаза позволила установить некоторые ассоциации между различными микробиомами и состоянием здоровья. Например, было обнаружено, что состав микрофлоры кишечника может влиять на риск развития метаболических заболеваний, таких как диабет и ожирение.

— Осознание роли микробиоты. Результаты проекта стали основой для дальнейшего изучения роли микробиоты в иммунной системе, пищеварении и

метаболизме, а также ее влияния на различные заболевания, что открыло новые перспективы для медицины и здравоохранения.

Таким образом, первая фаза проекта The Human Microbiome Project (HMP) заложила основы для будущих исследований микробиома и его последствий для человеческого здоровья, продемонстрировав важность микробных сообществ в поддержании гомеостаза и развитии различных заболеваний⁸.

В 2012 году были опубликованы первоначальные результаты, вызвавшие большой резонанс и положительную реакцию в научном мире⁹, изменив взгляд на биологию человека и факторы развития многих заболеваний.

Реализация второй фазы проекта The Human Microbiome Project (HMP), известной как Интегративный проект «Микробиом человека», началась в 2014 году и сосредоточилась на более глубоком понимании взаимосвязи между микробиотой и здоровьем человека. Эта фаза была направлена на интеграцию данных, полученных в первой фазе, с клиническими исследованиями и другими подходами для оценки функционального значения микробиоты и ее влияния на разнообразные аспекты здоровья.

Сутью второй фазы являлись:

1. Интеграция данных. Объединение данных о микробиоте с клиническими, метагеномными и метаболомными данными, а также проведение комплексного анализа для выявления взаимосвязей между микробиотой и состоянием здоровья.

2. Функциональное исследование. Анализ функции микробиоты, не только видовая принадлежность и таксономический состав, но и метаболические пути взаимодействия и влияния на физиологические процессы в организме, что включало в себя изучение метаболитов, синтезируемых микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности.

3. Моделирование заболеваний. Исследование, направленное на выяснение роли микробиоты в патогенезе различных болезней, включая метаболические расстройства, воспалительные заболевания и аллергии.

4. Сравнительные исследования. Проводились сравнительные исследования микробиоты у людей с различными заболеваниями, что позволяло выявить особенности корреляции состава микробиоты с конкретными состояниями.

⁸ Human microbiome project: Diversity of human microbes greater than previously predicted (Science Daily).

⁹ NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. NIH News. 2012. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-human-microbiome-project-defines-normal-bacterial-makeup-body>.

Результаты второй фазы:

— Углубленное понимание микробиоты. Получена более расширенная информация о видах микроорганизмов, их функциях и взаимодействиях с человеческим организмом, что помогло научному сообществу лучше понять, как микробиота влияет на здоровье и заболевания.

— Ассоциации между микробиотой и заболеваниями. Установлено множество новых ассоциаций между состоянием микробиоты и различными заболеваниями, включая тяжелые формы метаболических заболеваний, такие как диабет и сердечно-сосудистые заболевания.

— Клиническое применение. Полученные данные открыли возможности для разработки новых терапевтических подходов, основанных на микробиоте. Это может включать использование пробиотиков, пребиотиков и даже фекальной трансплантации для восстановления нормального баланса микробиоты в организме.

— Устойчивость микробиома. Исследования показали, что микробиота является динамичной экосистемой, которая реагирует на изменения в образе жизни, диете и внешней среде. Это понимание имеет важное значение для прогнозирования влияния образа жизни на здоровье человека.

Таким образом, вторая фаза Интегративного проекта «Микробиом человека» значительно расширила наши знания о микробиоме и его роли в здоровье, создав основу для будущих исследований и практического применения, направленного на улучшение здоровья и качества жизни человека.

Одним из основополагающих компонентов проекта стала метагеномика, открывшая широкую генетическую перспективу в пределах отдельно взятого микробного сообщества, и обширное определение последовательности полного генома, обеспечивающее более пристальный взгляд на микробные сообщества (совокупность популяций разных видов микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе). Полученные результаты оказали значительное влияние на адресное секвенирование геномов, сосредоточив внимание на таксономической структуре микробиома, специфичной для отдельных топографических локализаций органов и систем человека, и раскрыли дальнейшие перспективы для будущих полномасштабных исследований.

3. Общая патология и микробиом

Трудно осознать, что микроорганизмы, такие как бактерии, вирусы, грибы и археи, обитающие в человеческом организме, имеют непосредственное влияние на большинство заболеваний, за исключением тех, которые обусловлены травматическими факторами.

Сегодня микробиом, представляющий собой экосистему микроорганизмов, обитающих в человеческом организме, можно рассматривать как самостоятельный орган. Современные исследования подтверждают наличие прямой взаимосвязи между характеристиками микробиоты (ее составом и разнообразием) и состоянием здоровья хозяина.

Как метагеномные, так и эпидемиологические исследования указывают на жизненно важную роль микробиома человека в предотвращении широкого спектра заболеваний, от диабета 2-го типа и ожирения до воспалительных заболеваний кишечника, болезни Паркинсона и даже таких состояний нарушения психического здоровья, как депрессия¹⁰.

Симбиотические отношения между кишечной микробиотой и бактериями имеют решающее значение для оптимизации иммунного ответа человека, играя роль в защите от инфекций, регуляции воспалительных процессов и поддержании гомеостаз за счет основных положений:

1. Обогащение разнообразия микроорганизмов.

Кишечная микробиота состоит из миллиардов бактерий, грибов и вирусов, которые взаимодействуют между собой и с хозяином. Эти симбиотические отношения способствуют обогащению микробного разнообразия и улучшению устойчивости к внешним патогенам.

2. Модуляция иммунного ответа.

Симбиотические бактерии способны взаимодействовать с иммунной системой хозяина, что в значительной мере влияет на ее функционирование. Например, некоторые штаммы пробиотических бактерий могут способствовать активации Т-клеток и активному производству антител, что усиливает защитные реакции организма на патогены.

3. Выработка метаболитов.

Микробиота кишечника производит различные метаболиты, включая короткоцепочные жирные кислоты (например, бутират), которые играют

¹⁰ Copeland C. S. The World Within Us: Health and the Human Microbiome. Healthcare Journal of New Orleans, Sept-Oct 2017.

ключевую роль в иммуностимуляции. Эти метаболиты могут активно воздействовать на иммунные клетки, такие как макрофаги и дендритные клетки, улучшая их способность реагировать на инфекции и регулируя воспалительные процессы.

4. Защита слизистой оболочки.

Симбиотические отношения с полезными микробами способствуют поддержанию целостности слизистой оболочки кишечника. Здоровая микробиота помогает предотвратить чрезмерный рост патогенов, тем самым снижая риск развития воспалительных заболеваний, таких как болезнь Крона и язвенный колит.

5. Иммунная толерантность.

Микробиота участвует в формировании иммунной толерантности, что помогает организму различать между безвредными и потенциально опасными веществами. Компетентные симбиотические бактерии способны обучать иммунные клетки «узнавать» и «принимать» непатогенные антигены, предотвращая избыточные аллергические реакции и аутоиммунные процессы¹¹.

На начальных этапах развития данного направления лечение с использованием знаний о микробиоме демонстрирует многообещающие результаты, особенно в контексте лечения лекарственно-устойчивых инфекций и проблемы нарастающей антибиотикорезистентности, связанными с увеличением количества панрезистентных штаммов.

Одним из ярких примеров прогрессивного подхода является использование фекальной трансплантации, что обсуждается в работе Liubakka и Vaughn (2016) при рассмотрении патогенеза и проблемы резистентности на примере *Clostridium difficile* (*C. difficile*) которая является одним из основных возбудителей, антибиотик-ассоциированных диареей и воспалительных заболеваний кишечника. Инфекции, вызванные *C. difficile*, становятся все более сложными для лечения из-за непосредственного воздействия антибиотикотерапии, которая не только подавляет патогены, но и нарушает баланс микробиоты, что создает условия для колонизации патогенными штаммами. Это приводит к волне устойчивости к антибиотикам, формированию панрезистентных штаммов и частым рецидивам инфекций. В своей работе ученые рассматривают фекальную трансплантацию (ФТ) как стратегию, при которой фекальные образцы здоровых доноров вводятся в кишечник пациента с целью восстановления нормального баланса микробиоты. Метод показал высокую эффективность при

¹¹ Honda K., Littman Dan R. (7 July 2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. Nature. 535 (7610): 75–84. Bibcode: 2016. Natur.535...75H. doi: 10.1038/nature18848.

лечении инфекций *C. difficile*, особенно в случаях, когда традиционная антибиотикотерапия не приводит к успеху или приводит к рецидивам¹².

Особое место в данном контексте занимает лечение такой грозной и распространенной патологии, как сахарный диабет, который представляет собой сложную задачу, требующую многоуровневого подхода. В работе Burton и коллег (2015) исследован потенциал моделей кишечной микробиоты, которые могли в значительной степени улучшить эффективность традиционного лечения диабета. Как известно сахарный диабет, особенно 2-го типа, характеризуется инсулиновой резистентностью и нарушением глюкозного обмена. Традиционно лечится с помощью метформина — препарата, который улучшает чувствительность к инсулину и снижает уровень глюкозы в крови. Однако не все пациенты могут переносить метформин из-за его побочных эффектов, таких как диспептические расстройства, что может ограничивать его использование. В исследовании были представлены данные, свидетельствующие о том, что добавление модулятора кишечной микробиоты к лечению метформином может привести к значительному улучшению переносимости препарата, а также помочь в нормализации уровней глюкозы натощак. Модуляторы кишечной микробиоты действуют на микробный состав кишечника, способствуя изменению метаболических процессов. Предполагается, что модульные соединения могут способствовать увеличению количества полезных микроорганизмов, которые участвуют в метаболизме углеводов и жиров. Эти изменения могут облегчать процессы, связанные с усвоением метформина, а также нивелировать побочные эффекты. Исследование показало, что пациенты, принимавшие модулер кишечной микробиоты в сочетании с метформином, имели более низкие уровни глюкозы натощак и проявляли меньшую восприимчивость к побочным эффектам препарата, что свидетельствовало о высокой степени переносимости и эффективности комбинированного лечения. Поскольку модулеры кишечной микробиоты способны влиять на метаболиты, вырабатываемые микробами, они могут активировать различные метаболические пути, что приводит к снижению инсулинорезистентности и улучшению контроля уровня глюкозы.

Таким образом, интеграция знаний о микробиоме и его модуляции в терапию сахарного диабета представляет собой многообещающий подход, который может значительно улучшить исходы лечения. Работа Burton и соавторов подчеркивает, что использование модулеров кишечной микробиоты в качестве дополнения к традиционным методам лечения может улучшить перене-

¹² Liubakka A., Vaughn B. P. (2016). *Clostridium difficile* Infection and Fecal Microbiota Transplant. AACN Advanced Critical Care. 27 (3): 324–337. doi: 10.4037/aacnacc2016703.

симось метформина и способствовать более эффективному контролю глюкозы, что является важным шагом в терапии сложной и распространенной патологии, такой как сахарный диабет¹³.

Живущие в человеческом организме бактерии, в частности кишечные микроорганизмы, представляют собой не просто комменсалов, которые временно обитают в симбиотических отношениях с хозяином. Они являются полноправными обитателями нашего организма, находясь в состоянии коэволюции, которая охватывает тысячелетия взаимодействия между человеком и микробиотой. Эти бактерии участвуют в сложной системе взаимовлияния на физиологические и метаболические процессы хозяина, способствуя поддержанию гомеостаза.

Кишечные бактерии выполняют несколько ключевых функций, которые являются критически важными для здоровья. Во-первых, они продуцируют разнообразные питательные вещества, такие как витамины группы В и витамин К, что существенно влияет на метаболические процессы и общее состояние организма. Во-вторых, данные микроорганизмы играют важную роль в предотвращении инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами, за счет конкуренции за ресурсы и места обитания, а также за счет выработки антимикробных веществ, что делает их важными компонентами первой линии защиты. Кроме того, модулируют иммунный ответ хозяина, способствуя формированию и поддержанию иммунной толерантности. Они участвуют в обучении иммунной системы. Симбиотические отношения между кишечной микробиотой и организмом хозяина способствуют формированию иммунной толерантности, что помогает предотвращать нежелательные иммунные реакции на безвредные антигены, поступающие с пищей и из окружающей среды. Это, в свою очередь, снижает риск развития аллергических реакций и аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, кишечные бактерии выступают не только как пассивные комменсалы, но как активные и необходимые участники сложной экосистемы человеческого организма, влияя на его физиологические и иммунологические аспекты жизни.

¹³ Burton J. H., Johnson M., Johnson J., Hsia D. S., Greenway F. L., Heiman M. L. (2015). Addition of a Gastrointestinal Microbiome Modulator to Metformin Improves Metformin Tolerance and Fasting Glucose Levels. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 9 (4): 808–814. doi: 10.1177/1932296815577425.

4. Онкологические заболевания и микробиом

На протяжении длительной истории онкологии традиционные методы лечения, такие как хирургическое вмешательство с тотальным удалением опухолей, последующая химио- и радиотерапия, стали стандартами в терапии онкологических заболеваний. Эти подходы направлены на устранение первичной опухоли и метастазов, однако они зачастую сопровождаются серьезными побочными эффектами и могут не обеспечивать оптимальные результаты в случаях агрессивных и резистентных форм рака.

Современные достижения молекулярной биологии и генетики открывают новые горизонты в лечении онкологических заболеваний, что делает генную терапию перспективным методом, способным изменить традиционные подходы. Генная терапия предполагает внедрение, модификацию или удаление генов внутри клеток пациента для лечения или предотвращения заболеваний. Это может включать как восстановление функций, потерянных генов-супрессоров опухолей, так и модификацию экспрессии онкогенных последовательностей.

Основные преимущества генной терапии:

1. Точечное воздействие.

Генная терапия позволяет адресовать именно пораженные клетки, что может уменьшить повреждения здоровой ткани по сравнению с традиционными методами лечения.

2. Устойчивый антиопухолевый эффект.

После внесения изменений в генетический материал опухолевых клеток можно добиться не только временного, но и длительного эффекта, что снижает риск рецидивов.

3. Индивидуализированный подход.

Позволяет создавать целенаправленные терапевтические стратегии на основе генетических профилей конкретного пациента и его опухоли, что может повысить эффективность лечения.

4. Профилактика заболеваний.

Генная терапия не только лечит уже существующие опухоли, но и имеет потенциал в области профилактики путем коррекции наследственных генов, предрасполагающих к развитию рака.

Молекулярно-генетическое тестирование позволяет определить точную нуклеотидную последовательность ДНК в опухолевых клетках пациентов.

Нормальные клетки организма характеризуются стабильностью и гомологичностью своего генома, тогда как раковые клетки демонстрируют наличие многочисленных мутаций, включая точечные замены, делеции, вставки и хромосомные перестройки. Эти изменения приводят к появлению новых свойств клеток, способствующих развитию злокачественной трансформации, росту первичной опухоли и формированию отдаленных метастазов.

Генетический профиль рака формируется постепенно, начиная с одиночных нарушений репликативного процесса и системы репарации ДНК. Мутации затрагивают ключевые регуляторные гены — протоонкогены и супрессоры опухолей, приводя к нарушению механизмов контроля клеточного цикла, апоптоза и дифференцировки. Например, активация онкогенов типа RAS, MYC или BRAF способствует ускоренному делению и пролиферации клеток, тогда как потеря активности генов-супрессоров, таких как TP53, RB1 или PTEN, устраняет механизмы защиты от неконтролируемого роста.

Кроме того, важные роли играют эпигенетические модификации, такие как метилирование ДНК и модификация гистонов, влияющие на экспрессию генов без изменения самой последовательности ДНК. Накопление множественных генетических и эпигенетических аномалий в ходе развития новообразования создает специфичный фенотип каждой отдельной опухоли, определяющий ее агрессивность, чувствительность к терапии и клинический исход заболевания. Онкологический процесс зачастую представляет собой сочетание генетических заболеваний самого пациента и факторов окружающей среды. Примерно в 20% случаев возникновения онкологических заболеваний вовлечены микроорганизмы¹⁴. В частности, для потенциальных факторов рака развития толстой кишки, плотность бактерий в миллион раз выше, чем в тонкой кишке, и примерно в 12 раз больше случаев рака в толстом кишечнике по сравнению с тонкой кишкой. Возможно, это устанавливает патогенную роль микробиоты в генезе рака толстой кишки и прямой кишки. В качестве прогностического инструмента при оценке колоректального рака может использоваться микробиологическая плотность.

Микробиота может влиять на канцерогенез тремя основными путями:

- изменением баланса пролиферации и гибели опухолевых клеток;
- регулированием функций иммунной системы;
- влиянием на метаболизм факторов, принимаемых хозяином, пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

¹⁴ Garrett W. S. (3 April 2015). Cancer and the microbiota. *Science*. 348 (6230): 80–6. Bibcode: 2015Sci...348...80G. doi: 10.1126/science.aaa4972.

Опухоли, возникающие на пограничных поверхностях, таких как кожа, ротоглотка, дыхательные пути, пищеварительный и мочеполовой тракты, содержат свой неповторимый микробный пейзаж. Хотя прямые причинные связи между наличием микробов в опухолевой ткани и ее развитием не установлены, микробиота может указывать на кислородное напряжение в опухолевом окружении или влиять на ее питательный профиль. Из примерно 1030 известных микробов всего десять были определены Международным агентством по изучению рака как канцерогены для человека.

Микроорганизмы могут секретировать белки или другие факторы, которые непосредственно влияют на пролиферацию клеток или могут усиливать, или ослаблять иммунную систему хозяина, в том числе вызывать острое или хроническое воспаление, которое способствует канцерогенезу.

Следует помнить, что клетки вооружены специальными сигнальными системами и механизмами, защищающими от развития опухолей:

— Импринтинг — механизм эпигенетических модификаций, контролирующей нормальный рост и правильное развитие организма. Любые нарушения в метилировании определенных генов способствуют возникновению раковых опухолей. В исследованиях было обнаружено, что потеря импринтинга после инактивации материнского аллеля гена IgF2 увеличивает риск развития рака прямой кишки в 3–5 раз. В своей статье Гарретт „Cancer and the microbiota“ в журнале Science раскрывает взаимосвязь между микробиотой и развитием раковых опухолей. Исследование подчеркивает, что микробиом может активно влиять на онкогенез как положительно, так и отрицательно, взаимодействуя с различными сигнальными путями и иммунными механизмами организма. Гарретт отмечает, что микробиота может участвовать в индукции воспалительных процессов, которые играют ключевую роль в развитии некоторых видов рака. Хроническое воспаление, вызванное патогенной микрофлорой, может привести к повреждению клеток и тканей, способствуя канцерогенезу. Также микробиота влияет на иммунную систему, модулируя ее реакции. Это включает поддержание толерантности к микробам и контроль над воспалительными реакциями. Нарушение этого баланса может способствовать развитию опухолей из-за снижения способности иммунной системы обнаруживать и уничтожать аномальные клетки. В проведенном исследовании приводятся наглядные примеры участия определенных бактерий в онкогенезе, таких как *Helicobacter pylori*, которая связана с раком желудка, и *Fusobacterium nucleatum*, вовлеченная в развитие колоректального рака. Эти бактерии могут изменять локальную и системную иммунную среду, что приводит к опухолевому развитию. Таким образом, работа Гарретта демонстрирует, как микробиом может прийти на помощь или, напротив, усугубить риск развития рака через сложный комплекс

взаимодействий с иммунной системой и эпигенетическими механизмами клетки. Это подчеркивает необходимость глубокого изучения микробиоты для разработки новых подходов к профилактике и лечению рака¹⁵.

— Репарация ДНК — например, однонуклеотидная эксцизионная репарация защищает ДНК от мутаций, вызванных канцерогенными агентами. В статье Эрролла С. Фридберга „How nucleotide excision repair protects against cancer“ обсуждается важность системы репарации ДНК в защите клеток от мутаций, которые могут привести к раку. Однонуклеотидная эксцизионная репарация (NER) играет ключевую роль в этом процессе, устраняя повреждения ДНК, вызванные воздействием различных канцерогенных агентов, таких как ультрафиолетовое излучение и химические мутагены. Механизм эксцизионной репарации: NER обнаруживает и удаляет повреждения в ДНК, например, димеризацию пиримидинов, к чему могут приводить ультрафиолетовые лучи. Репарация включает несколько шагов: узнавание повреждения, разрезание цепи ДНК вокруг поврежденного участка, удаление поврежденного сегмента и заполнение образовавшегося разрыва с использованием неповрежденной цепи в качестве шаблона. Однонуклеотидная эксцизионная репарация предотвращает мутации, которые могут возникнуть, если повреждения ДНК остаются неисправленными. Эти мутации могут быть иницирующими событиями в канцерогенезе, изменяя структуру и функцию ключевых генов, таких как протоонкогены или гены-супрессоры опухолей. Дефекты в NER могут привести к генетическим заболеваниям, таким как ксеродерма пигментозум, что приводит к высокой чувствительности к солнечному свету и повышенному риску кожного рака. Это подчеркивает важность эффективной работы системы репарации ДНК как механизма защиты от рака. Исследование Фридберга подчеркивает критическую роль NER в предотвращении канцерогенеза, устраняя повреждения, прежде чем они смогут инициировать или способствовать развитию раковых изменений в клетках¹⁶.

— Контрольные точки клеточного цикла — используют специфичные белки-мессенжеры, такие как ATM, ATR и комплекс RAD17-RFC для поиска повреждений в молекулах ДНК. Сигнальные белки активируют p53 и инактивируют циклин-зависимые киназы, что, в свою очередь, ингибирует клеточный цикл от G1 до S (G1/S точка рестрикции), репликацию ДНК в S-фазе и G2-фазу (G2/M-точка рестрикции).

¹⁵ H. Cui (2003). Loss of IGF2 Imprinting: A Potential Marker of Colorectal Cancer Risk. *Science*. 299, 1753–1755.

¹⁶ Errol C. Friedberg (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 1, 22–33.

Статья, написанная Азизом Санкаром и соавторами, „Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints“, подробно описывает молекулярные механизмы, которые клетки используют для реагирования на повреждения ДНК и регуляции клеточного цикла, и объясняет, как синхронизация и координация между этими белковыми механизмами предотвращают возможное злокачественное преобразование клеток, давая клетке время и средства для восстановления повреждений в ДНК¹⁷.

— Программируемая клеточная смерть — апоптоз и связанные регуляторные гены имеют огромное влияние на возникновение злокачественного фенотипа. Некоторые онкогенные мутации нарушают апоптоз, что приводит к инициации канцерогенеза и метастазирования. В своей работе „Apoptosis in cancer“ Скотт У. Лоу и Афина В. Лин излагают важность апоптоза в формировании раковых клеток и как сбои в этом механизме могут привести к развитию злокачественного фенотипа.

Апоптоз, или программируемая клеточная смерть, является важным механизмом, который позволяет организму удалять поврежденные или ненужные клетки. Этот процесс контролируется рядом генов, включая те, которые продуцируют белки семейства Bcl-2, каспазы и факторы транскрипции, такие как p53. Нарушения в регуляции апоптоза могут способствовать канцерогенезу. Некоторые онкогенные мутации, такие как мутация в гене p53, приводят к несвоевременному прекращению апоптоза, позволяя поврежденным клеткам выживать и накапливать дополнительные мутации, что ускоряет процесс трансформации нормальных клеток в раковые.

Инициация и прогрессирование онкопроцесса увеличивает способность опухолевых клеток выживать в условиях стресса, что, в свою очередь, может приводить к инвазии и метастазированию, так как раковые клетки обогащаются свойствами, способствующими их агрессивному поведению.

Работа Лоу и Лин подчеркивает центральную роль апоптоза в поддержании клеточного гомеостаза и говорит, как его сбои могут привести к агрессивному росту опухоли и метастазированию¹⁸.

— Иммунная система — активация естественных киллеров (NK — natural killer cells), макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и специфических Т-цитотоксических клеток синтез цитокинов и специфических антител Исследование Якобисака и соавторов подчеркивает важность интеграции врожденного и адаптивного иммунных ответов в защите организма от рака и дает представление о том,

¹⁷ Aziz Sancar, Laura A. Lindsey-Boltz, Keziban Ünsal-Kaçmaz, Stuart Linn. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.

¹⁸ Scott W. Lowe, Athena W. Lin. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21, 485–495.

как эти природные механизмы могут быть использованы в иммунной терапии для улучшения противоопухолевой защиты¹⁹.

Взаимосвязь между иммунной функцией и развитием иммунного ответа является сложной и многогранной, поскольку специфические реакции иммунной системы и воспалительные процессы взаимодействуют друг с другом на различных уровнях. Барьеры слизистых оболочек подвержены рискам повреждения и должны быстро восстанавливаться для поддержания гомеостаза. Нарушение устойчивости гомеостаза хозяина или самой микробиоты снижает устойчивость к злокачественным новообразованиям, вызывая воспаление и развитие онкопроцесса.

Активация системы фагоцитирующих мононуклеаров (макрофагов) формирует вокруг очага воспаления мощную соединительнотканную капсулу, одновременно угнетая функции системы макрофагов, и способствует увеличению зоны некроза. После преодоления защитных барьеров микробы могут вызывать провоспалительные или иммуносупрессивные программы различными путями. Например, связанные с развитием онкологических заболеваний микроорганизмы, по-видимому, активируют сигнальный путь NF-κB в микроокружении опухоли. Другие рецепторы распознавания образов, такие как нуклеотид-связывающие члены семейства олигомеризационных домено-подобных рецепторов (NLR) NOD-2, NLRP3, NLRP6 и NLRP12, могут играть роль в опосредовании колоректального рака. В своей работе Gagnière и соавторы подробно рассматривают связь между дисбалансом кишечной микробиоты и развитием колоректального рака, акцентируя внимание на роли различных сигнальных путей и рецепторов. В контексте онкопатологии толстой кишки статья подчеркивает, что дисфункция или неправильное регулирование рецепторов может способствовать нарушению целостности кишечного барьера и чрезмерному воспалению. Например, неправильное функционирование NLRP6 связано с нарушением гомеостаза микробиоты, что может способствовать развитию воспалительных заболеваний кишечника и в конечном счете рака толстого кишечника²⁰.

В результате следует отметить, что изменение состава микробиоты может стать важным дополнением к существующим методам лечения онкологических заболеваний, включая оперативное вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, таргетную и иммунотерапию.

¹⁹ Marek Jakóbsiak, Witold Lasek, Jakub Gołąb. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters*. 90, 103–122.

²⁰ Gagnière J., Raisch J., Veziant J., Barnich N., Bonnet R., Buc E., Bringer M. A., Pezet D., Bonnet M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 22 (2): 501–518. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.501.

5. Роль этнической принадлежности в вариациях микробиома

Несмотря на присущую нам толерантность и терпимость к расовым предубеждениям, сегодня уже известно, что кишечный микробиом имеет существенные различия среди этнических групп, которые обусловлены не цветом кожи и не разрезом глаз, а исключительно сложившийся на протяжении многих веков пищевым стереотипом. Именно это определяет специфику спектра кишечной структуры микробиоты.

Исследования, проведенные в Государственном университете штата Огайо, доказали, что разнообразие бактерий полости рта по вариативности можно сравнить с папиллярными узорами. Оказалось, что бактерии полости рта могут указать на происхождение человека.

Несмотря на актуальность вопроса, результаты исследований, изучающих взаимосвязь этнической принадлежности в вариации микробиома, стали появляться только в последние годы, что дало возможность оценивать разнообразие микробиома на глобальном популяционном уровне.

Развитие сельского хозяйства и животноводства, переход от кочевого образа жизни к оседлому, урбанизация и переход к более западному образу жизни кардинально повлияли на состав микробиома человека.

Утверждение о большом разнообразии микробиомов в различных тканях и популяциях человека, основанное на исследовании Pasolli E. и соавторов (2019), подчеркивает многие ключевые аспекты в разнообразии микробиома. Исследование 9 428 метагеномов и реконструкция 154 723 микробных геномов показывают, что микробиота человека значительно варьируется не только в зависимости от топографического расположения (например, кишечник, кожа, слизистые оболочки), но и от таких факторов, как возраст, социальный статус и образ жизни. Понимание этого разнообразия имеет важное значение для медицины, особенно в контексте индивидуализированного подхода к лечению заболеваний. Микробиота может влиять на эффективность терапии, включая химиотерапию и иммунотерапию, а также на предрасположенность к различным заболеваниям. Это подчеркивает необходимость дальнейших исследований для более полного понимания роли микробиоты в здоровье и болезни²¹.

²¹ Pasolli E., Asnicar F., Manara S., Zolfo M., Karcher N., Armanini F., Beghini F., Manghi P., Tett A., Ghensi P., Collado M. C., Rice B. L., Du Long C., Morgan X. C., Golden C. D.,

Триллионы микроорганизмов, населяющих человеческий кишечник, рассматриваются как потенциальные ключевые факторы здоровья²².

Такие характеристики, как диета, образ жизни или генетика, могут формировать состав кишечной микробиоты и обычно разделяются лицами сопоставимого этнического происхождения. Статья, написанная Zhernakova и соавторами, подчеркивают важность данной концепции. Исследование, проведенное на уровне популяции, показало, что эти факторы могут влиять на состав и разнообразие микробиоты и демонстрируют их взаимодействие, формируя уникальный микробный профиль каждого человека. Они также подчеркивают важность персонализированного подхода в изучении микробиоты, учитывая индивидуальные особенности каждого человека²³.

Исследование, проведенное Rothschild и коллегами, показало, что факторы окружающей среды больше влияют на состав кишечной микробиоты, чем генетика хозяина. Это исследование подчеркивает значимость образа жизни, диеты и других внешних факторов в формировании микробиома. Таким образом, этнические различия в составе кишечной микробиоты могут быть связаны скорее с разными привычками и условиями жизни, чем с генетическими различиями. До сих пор многие исследования уделяли внимание изучению различных этнических групп в отдельных географических регионах, что важно для выявления уникальных характеристик микробиома, связанных с определенными культурными и экосистемными факторами этих групп, что подчеркивает сложность изучения взаимодействия между генетическими и окружающими факторами в формировании микробиоты²⁴.

Этническая принадлежность способствовала объяснению межиндивидуальных различий в составе кишечной микробиоты, с тремя основными полюсами, в первую очередь характеризруемыми оперативными таксономическими единицами (OTU), классифицированными как *Prevotella* (марокканцы, турки, ганцы), *Bacteroides* (африканские суринамцы, южноазиатские суринамцы) и

Quince C., Huttenhower C., Segata N. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*. 2019 Jan 24; 176 (3):649–662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.

²² Schroeder B. O., Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 22, 1079–1089 (2016); Lynch S. V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2369–2379 (2016).

²³ Zhernakova A. et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 352, 565–569 (2016); Falony G. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352, 560–564 (2016); Goodrich J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799 (2014).

²⁴ Rothschild D. et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555, 210–215 (2018).

Clostridiales (голландцы). Голландцы продемонстрировали наибольшее α -разнообразие кишечной микробиоты, а суринамцы Южной Азии — наименьшее с соответствующим обогащением или истощением в многочисленных OTU. Этнические различия в α -разнообразии и межиндивидуальные различия не зависели от метаболического здоровья и лишь частично объяснялись этнически связанными характеристиками, включая социально-демографические, образ жизни или факторы питания. Данная связь продемонстрирована в исследовании HELIUS: Unravelling the impact of ethnicity on health in Europe.

Несмотря на то что масштабный анализ показал доминирующую роль факторов окружающей среды над генетикой в формировании кишечной микробиоты (Rothschild et al., Nature 2018), результаты городской когорты HELIUS подтверждают, что внутри одного города люди одного этнического происхождения имеют сходные фекальные 16S-профили (HELIUS; Stronks et al., BMC Public Health 2013; Snijder et al., BMJ Open 2017; n = 2084). Это сходство, вероятно, отражает не прямой генетический эффект «этничности», а совокупность общих для этнических сообществ культурно-экологических факторов — диету, образ жизни, социально-экономические условия и локальную экологию. Важно учитывать, что 16S-секвенирование ограничено по таксономическому и функциональному разрешению, поэтому для разделения вкладов среды и генетики целесообразны метагеномные/метатранскриптомные подходы в сочетании с детальными данными о питании, медикаментах и условиях жизни и многоцентровыми когортами²⁵.

Следовательно, этническое происхождение людей может быть важным фактором, который следует учитывать при исследовании микробиомов и его потенциальном будущем применении в этнических обществах. Различия в составе фекальной микробиоты между людьми разного этнического происхождения, живущими в одном городе, вероятно, отражают совокупность культурно-диетических практик, социально-экономических условий, доступа к пище и медикаментам, а также локальной экологии и возможных генетических влияний; поэтому в дизайне исследований, стратификации анализов и при внедрении микробиом-ориентированных вмешательств целесообразно учитывать этническую принадлежность и сопутствующие ей социокультурные факторы, контролируя диету, лекарства и другие конфаундеры и применяя метагеномные/мультиомные подходы и многоцентровые когорты²⁶.

²⁵ Stronks K. et al. Unravelling the impact of ethnicity on health in Europe: the HELIUS study. BMC Public Health 13, 402 (2013); Snijder M. B. et al. Cohort profile: the Healthy Life in an Urban Setting (HELIUS) study in Amsterdam, The Netherlands. BMJ Open 7, e017873 (2017), (HELIUS).

²⁶ Mélanie Deschasaux, Kristien E. Bouter, Andrei Prodan, Evgeni Levin, Albert K. Groen, Hilde Herrema, Valentina Tremaroli, Guido J. Bakker, Ilias Attaye, Sara-Joan Pinto-Sietsma,

Рассматривая этнические особенности микробиома, необходимо остановиться на формировании его первоначального этапа, т. е. с момента рождения человека. «Береги микробиом смолоду» — хочется пожелать каждому новорожденному.

Исследования, проведенные группой ученых медицинского факультета Университета Макмастера (Гамильтон, Онтарио, Канада) под руководством Дженнифер К. Стернс, обнаружили, что на микробиом, создавший колонию в кишечнике малыша, влияет этническая принадлежность и грудное вскармливание на первом году жизни. Этнические различия в микробиоме отражают различия в питании матери и ребенка. Общеизвестно, что микроорганизмы быстро колонизируются в кишечнике младенца вскоре после рождения. Несмотря на то что состав кишечной микробиоты интенсивно меняется в течение первого года жизни под влиянием способа родов, грудного вскармливания, введения прикорма и воздействия антибиотиков, формирование относительно стабильного «взрослого» микробиома обычно завершается лишь в период примерно от 1 до 3 лет. Популяционные данные демонстрируют постепенную диверсификацию и созревание микробных сообществ с возрастом и различия в зависимости от географии; в частности, Yatsunenko et al. показали возрастные сдвиги в составе кишечной микробиоты и постепенное сближение детских профилей со взрослыми в течение первых нескольких лет жизни (Yatsunenko T. et al., *Nature* 2012). Эти наблюдения важны для разработки ранних интервенций и определения критических окон для целенаправленной модуляции микробиоты²⁷ и являются важным прогностическим параметром в определении будущего здоровья.

Результаты ряда исследований показывают, что формирование кишечного микробиома новорожденного определяется не только наследственным генетическим фоном родителей, но и антимикробной экспозицией пары в течение жизни и в прегравидарном периоде, а также способом родоразрешения. Антибиотикопрофилактика и системная антибиотикотерапия у матери и/или отца изменяют состав и резервы микробиоты родителей, что сказывается на

Daniel H. van Raalte, Marieke B. Snijder, Mary Nicolaou, Ron Peters, Aeilko H. Zwinderman, Fredrik Bäckhed and Max Nieuwdorp. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nature Medicine*. Vol 24. October 2018. 1526–1531 // www.nature.com/naturemedicine.

²⁷ Yatsunenko T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R. N., Anokhin A. P., Heath A. C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J. G., Lozupone C. A., Lauber C., Clemente J. C., Knights D., Knight R., Gordon J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9; 486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053. PMID: 22699611; PMCID: PMC3376388.

исходном микробном «засеве» ребенка; кесарево сечение ограничивает контакт новорожденного с вагинальной и перинатальной микрофлорой, тогда как естественные роды обеспечивают более широкий спектр вертикальной передачи микроорганизмов — все это влияет на разнообразие, стабильность и траекторию созревания микробиоты в раннем возрасте. Эти факторы были подробно показаны в работах, демонстрирующих, что антибиотики, режим родов и питание формируют созревание микробиоты в раннем детстве (Bokulich NA et al., *Sci Transl Med* 2016). Учитывая потенциальные долгосрочные последствия для метаболического и иммунного развития, такие данные обосновывают внимание к антимикробной политике в периоды до и во время беременности, а также к выбору перинатальных практик и стратегии вмешательств²⁸.

В дополнение к уже установленным ролям в пищеварении и формировании иммунной толерантности, кишечная микробиота все чаще рассматривается как потенциально важный фактор в развитии неинфекционных заболеваний, связанных с ожирением, включая сахарный диабет 2-го типа. Метагеномное исследование ассоциаций Qin et al. продемонстрировало характерные таксономические и функциональные сдвиги у больных сахарным диабетом — в частности, снижение числа пробиотически полезных и butyrate-продуцирующих таксонов и обогащение условно-патогенных микроорганизмов, а также изменение метаболических путей микробиоты. Эти изменения могут способствовать метаболическим нарушениям через снижение продукции короткоцепочечных жирных кислот, усиление интестинальной проницаемости, системную воспалительную активацию и повышение экспозиции липополисахаридов (метаболическая эндотоксемия). Следовательно, микробиом выступает и как потенциальный биомаркер риска, и как цель для вмешательств (диетические модификации, пребиотики/пробиотики, фекальная трансплантация), направленных на профилактику и лечение заболеваний, связанных с ожирением (Qin J. et al., *Nature* 2012) и сахарным диабетом 2-го типа²⁹.

²⁸ Bokulich N. A., Chung J., Battaglia T., Henderson N., Jay M., Li H., D. Lieber A., Wu F., Perez-Perez G. I., Chen Y., Schweizer W., Zheng X., Contreras M., Dominguez-Bello M. G., Blaser M. J. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*. 2016 Jun 15; 8(343):343ra82. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121. PMID: 27306664; PMCID: PMC5308924.

²⁹ Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., Li Z., Tang A., Zhong S., Li X., Chen W., Xu R., Wang M., Feng Q., Gong M., Yu J., Zhang Y., Zhang M., Hansen T., Sanchez G., Raes J., Falony G., Okuda S., Almeida M., LeChatelier E., Renault P., Pons N., Batto J. M., Zhang Z., Chen H., Yang R., Zheng W., Li S., Yang H., Wang J., Ehrlich S D., Nielsen R., Pedersen O., Kristiansen K., Wang J. A metagenome-wide association

Появляющиеся данные указывают на важную роль кишечной микробиоты в развитии аллергий и атопического дерматита в раннем детском возрасте. Исследования показывают, что у младенцев с атопическим дерматитом чаще наблюдаются признаки раннего дисбиоза — сниженное микробное разнообразие и сдвиги в составе (например, обеднение *Bifidobacterium* и/или обогащение условно-патогенных таксонов), а также влияние перинатальных факторов (антибиотики, кесарево сечение, искусственное вскармливание) на траекторию колонизации. Механически эти изменения могут способствовать нарушению иммунной регуляции (сдвиг баланса Th1/Th2, уменьшение регуляторных Т-клеток), повышенной проницаемости кишечника и усилению системного аллергического ответа, что было отражено в обзоре и эмпирических данных Penders et al. (J Allergy Clin Immunol. 2013). В свете этих результатов целесообразно учитывать раннюю микробную колонизацию при разработке профилактических и терапевтических стратегий против атопии³⁰ и различные воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), так как кишечная микробиота играет ключевую роль в патогенезе данной патологии через сложное взаимодействие с генетикой хозяина и факторами среды: генетические варианты, связанные с иммунным ответом и барьерной функцией (например, NOD2, ATG16L1 и другие локации, идентифицированные в GWAS), модифицируют восприятие и обработку микробных сигналов, что в условиях дисбиоза — снижения полезного разнообразия и сдвига таксономии в сторону *Proteobacteria* и других условно-патогенных таксонов — приводит к хронической воспалительной активации. Knights и соавт. подчеркивают, что у предрасположенных по генотипу пациентов нарушения микробной экологии могут усиливать экспрессию провоспалительных путей, нарушать эпителиальный барьер и ферментативный профиль микробиоты (например, снижение продукции короткоцепочечных жирных кислот), способствуя запуску и поддержанию воспаления. Понимание этих взаимосвязей открывает путь к терапевтическим стратегиям, нацеленным на восстановление микробного равновесия и корректировку иммунной реакции, такие как диета, пробиотики/пребиотики, фекальная микробиота-терапия³¹.

study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4; 490(7418):55–60. doi: 10.1038/nature11450. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23023125.

³⁰ Penders J., Gerhold K., Stobberingh E. E., Thijs C., Zimmermann K., Lau S., Hamelmann E. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep; 132(3):601–607.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.043. Epub 2013 Jul 27. PMID: 23900058.

³¹ Knights D., Lassen K. G., Xavier R. J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*. 2013 Oct; 62(10):1505–10. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303954. PMID: 24037875; PMCID: PMC3822528.

6. Микробиом урогенитального тракта

Авторы: Фаниев М. В., Степанов В. С., Кадыров З. А.

Исследование микробиома — это новое и весьма перспективное направление, выводящее врачей разных специальностей на новый уровень знаний. Несмотря на то что микробиота мочевыводящих путей, роль которой в жизнедеятельности *corpus humanum* изучена гораздо хуже, чем микробиота, живущая в желудочно-кишечном тракте, однако природой на нее возложены очень сложные и ответственные задачи.

Уже достоверно известно, что микробиота урогенитального тракта занимает антагонистическую позицию по отношению к патологической микрофлоре. Вместе с тем с определенной долей уверенности, можно предположить, что бактерии мочевыводящих путей участвуют в реализации многих жизненно важных функций и, что нам особенно важно, репродуктивной.

Выявленный в ряде заболеваний мочеполовых органов дисбаланс микроорганизмов может быть одним из основных показателей патогенеза, ответственного за их развитие. Можно с уверенностью сказать, что изучения таксономического разнообразия структуры микробиоты урогенитального тракта будет фундаментом новых методов профилактики и лечения заболеваний мочевыводящих путей и репродуктивной системы.

Систематический обзор в регистре контролируемых исследований PubMed/MEDLINE/Cochrane, проведенный K. Skonieczna-Żydecka et al., указал на важную роль кишечной микробиоты в патогенезе развития хирургических инфекций и других послеоперационных осложнений.

В ходе исследований было установлено, что пробиотики и синбиотики значительно понижают возможность возникновения хирургических инфекций и иных послеоперационных нежелательных последствий оперативного вмешательства. Так, прооперированные пациенты, получавшие дополнительно пребиотики, пробиотики и синбиотики, по сравнению с плацебо (35 исследований, 3028 взрослых пациентов) имели достоверно низкий уровень С-реактивного белка (СРБ) и интерлейкина-6 (IL-6) В то же время у пациентов, получавших пробиотики, была повышена концентрация уксусной, масляной и пропионовой кислот.

Эти данные подтвердил метаанализ результаты которого показали, что значительное снижение количества послеоперационных осложнений (вздутие

живота, диарея, пневмония, сепсис, раневые инфекции и ИМП) напрямую связано с добавлением в рацион про- и синбиотиков. Кроме вышеуказанного, их применение снизило продолжительность антибактериальной терапии, послеоперационной гипертермии, сократило сроки введения жидкости и твердого питания, сроки пребывания в стационаре ($p < 0,05$)³².

Своеобразно построены связи у микробиот органов малого таза, особенно интересны взаимосвязи между влагалищем, мочевым пузырем и кишечником. Взаимоотношения микробиот органов малого таза сложны: несмотря на близость анатомических ниш и возможность миграции микроорганизмов между влагалищем, кишечником и мочевым пузырем, сообщества каждого органа демонстрируют свою таксономическую структуру и функциональную специализацию. Так, Pearce et al. с помощью культура-независимого 16s-профилирования показали, что микробиом мочевого пузыря существенно различается у женщин с ургентным недержанием мочи и без. Изменения касаются как состава, так и уровня разнообразия, при этом определенные таксоны ассоциированы с клиническим фенотипом. Эти данные указывают, что микробиота мочевого пузыря не является просто отражением вагинальной флоры и выполняет отличные от влагалищной функции, хотя межорганные взаимодействия и возможный перенос микроорганизмов остаются важными факторами. Для понимания патофизиологии и разработки терапевтических подходов необходимы синхронные мультилаговые исследования (влагалище, мочевой пузырь, кишечник) с тщательным контролем методов взятия проб и анализа. В результате исследования было установлено, что таксоны *Lactobacillus* в подавляющем большинстве доминируют в вагинальной микробиоте и считаются защитными бактериями, но вместе с тем они присутствуют и в мочевыводящих путях, причем специфические виды *Lactobacillus* могут варьироваться. *L. Gasseri* наиболее часто высеваются из мочевого пузыря женщин с ИМП. *L. Crispatus* чаще встречаются у женщин без симптомов ИМП³³.

Анализ мочи у 79 здоровых женщин, выполненный Curtiss et al., продемонстрировал зависимость состава микробиоты мочевого пузыря от возраста и менопаузального статуса: *Lactobacillus* встречались значительно чаще у женщин в пременопаузе, тогда как таксоны рода *Mobiluncus* были более характерны для постменопаузальной группы.

³² Skonieczna-Żydecka K. et al. A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression Evaluating the Efficacy and Mechanisms of Action of Probiotic and Synbiotic in the Prevention of Surgical Site Infection and Surgery-Related Complications. *J Clin Med*. 2018; 7(12):pii:E556. doi: 10.3390/jcm7120556.

³³ Pearce M.M. et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*. 2014; 5:e01283–14. doi: 10.1128/mBio.01283-14.

Эти наблюдения согласуются с известным влиянием эстрогенов на микробиоту — снижение уровня эстрогенов в постменопаузе уменьшает количество вагинального гликогена и способствует утрате лактобацилл, что, по-видимому, отражается и в микробиоте мочевого пузыря, создавая условия для доминирования других, потенциально неблагоприятных таксонов. Клинически это может иметь значение для восприимчивости к урологическим симптомам и инфекциям у пожилых женщин и подчеркивает необходимость учитывать менопаузальный статус при дизайне исследований и при выборе профилактических или лечебных стратегий (например, локальная гормональная терапия, пребиотики/пробиотики)³⁴.

Принято считать, что в норме в микробиоте влагалища доминируют лактобациллы, поддерживающие кислую среду и препятствующие колонизации условно-патогенных бактерий; в клинических наблюдениях наличие штаммов *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus* ассоциировалось с пониженной фертильностью как при естественном планировании беременности, так и в программах ЭКО. Исследования Hyman et al. показывают, что у пациенток, достигших беременности после переноса эмбрионов, вагинальные сообщества чаще были лактобациллярно-доминирующими и характеризовались меньшим альфа-разнообразием, тогда как более богатые и смешанные микробиоты коррелировали с худшими репродуктивными исходами. Эти результаты подразумевают, что низкое разнообразие вагинальной микробиоты в определенных контекстах может быть благоприятным для исхода ЭКО, однако имеющиеся данные пока предварительны и ассоциативны: для обоснования скрининга и терапевтической модуляции микробиоты при репродуктивной медицине необходимы крупные проспективные и интервенционные исследования³⁵.

Знания о составе мужской уретральной флоры крайне ограничены. В отличие от влагалищной микробиоты, где обычно выделяются доминирующие лактобациллы, у мужчин в уретральном биотопе нет одного-двух мажорных таксонов — бактериальные сообщества чаще представляют собой сложные, разнородные и переменные по составу экосистемы. Культура-независимые исследования, в частности работа Nelson et al., показали, что уретральный/мочевой микробиом у мужчин характеризуется высокой таксономической гетерогенностью и что определенные профили сообщества ассоциируются с бессимптомными инфекциями, включая ИППП. Эти особенности затрудняют простую классификацию «нормы» и требуют учета поведения (сексуальная

³⁴ Curtiss N. et al. Age, menopausal status and the bladder microbiome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018; 228:126–129. doi: 10.1016/j.ejogrb. 2018.06.011.

³⁵ Hyman R. W. et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in-vitro fertilization embryo transfer. *J. Assist. Reprp. Genet.* 2012; 29(2):105–115.

активность), методов взятия проб и влияния сопутствующих факторов при интерпретации данных. Понимание сложности мужского уретрального микробиома важно для разработки чувствительных диагностических подходов, выявления субклинических инфекций и оценки роли микробиоты в передаче и поддержании урогенитальных заболеваний, исследования³⁶.

В свою очередь, имеют место интересные сообщения о различиях в микробиологическом пейзаже у мужчин с сохранным препуцием и после циркумцизии. Исследования пенильной микробиоты демонстрируют, что состояние препуция существенно влияет на микробиологический ландшафт мужских гениталий и опосредованно — на риск вагинальных нарушений у партнерш. В когорте Ракаи Liu et al. показали, что у мужчин с сохранным препуцием преобладали более разнообразные анаэробные сообщества (включая *Prevotella*, *Sneathia*, *Dialister* и др.), тогда как после циркумцизии происходил устойчивый сдвиг в сторону кожеподобных таксонов и уменьшение доли анаэробов; эти изменения ассоциировались с пониженным риском бактериального вагиноза у женщин-партнерш. Данные указывают на то, что анатомо-микробиологические особенности мужских половых органов могут модифицировать вагинальную экологию через перенос микробных сообществ и опосредованное влияние на воспаление, и поэтому пенильная микробиота — важный фактор, который следует учитывать в профилактике и стратегии снижения распространенности бактериальных вагинозов.

В своей работе авторы обсуждают механизмы: удаление препуция разрушает анаэробную нишу, уменьшает бактериальную нагрузку и воспаление и тем самым снижает вероятность передачи анаэробных сообществ, предрасполагающих к развитию воспалительных заболеваний у партнерши. В свою очередь, следует учесть, что исследование ограничено конкретным географическим и поведенческим контекстом и требует подтверждения в разных популяциях и с контролем сексуального поведения³⁷.

В продолжение рассмотрения микробиоты мужских половых органов исследования спермы показывают ее прямую связь с качеством спермы и возможной фертильностью. Weng et al. провели метагеномное секвенирование спермы у мужчин из пар с бесплодием и выявили разнообразные бактериальные сообщества, которые образуют несколько типов микробиоты (включая лактобациллярно-доминантные и анаэробно-обогащенные профили).

³⁶ Nelson D. E., Van Der Pol B., Dong Q., Revanna K. V., Fan B., Easwaran S. et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate with Asymptomatic Sexually Transmitted Infection PLoS One. 2010 Nov 24; 5 (11): e14116.

³⁷ Liu C. M., Hungate B. A., Tobian A. A., Ravel J., Procter J. L., Serwadda D. et al. Penile microbiota and female partner bacterial vaginosis in Rakai, Uganda. MBio. 2015 Jun 16; 6 (3): e00589–15.

Мажорными таксонами среди структуры микробиоты эякулята были *Pseudomonas*, *Lactobacillus* или *Prevotella*. В группе, где доминировала *Lactobacillus*, была очень высокая пропорция нормальных сперматозоидов. Данная ситуация могла свидетельствовать о том, что как в женском репродуктивном тракте, так и в мужском некоторые виды *Lactobacillus* могут действовать как пробиотики, обеспечивая защиту от других, более вредных бактерий, наличие и относительная избыточность таких таксонов, как *Prevotella* и *Pseudomonas*, ассоциировались с ухудшением параметров спермы (снижение подвижности, морфологические нарушения и т. д.), тогда как доминирование *Lactobacillus* чаще коррелировало с более благоприятными показателями.

Эти данные дополняют ранее полученные наблюдения о пенильной микробиоте и подчеркивают, что не только поверхностные сообщества половых органов, но и микробиота спермы могут влиять на репродуктивные исходы; вместе с тем результаты остаются предварительными из-за кросс-секционного дизайна, риска контаминации при сборе проб и ограничения функционального разрешения 16S/метагеномных анализов³⁸.

Результаты комбинированного анализа масс-спектрометрии и 16S rDNA-секвенирования, проведенного Shoskes DA, Altemus J. et al. выявили значимые сдвиги в микробном метаболизме у мужчин с хроническим простатитом / синдромом хронической тазовой боли по сравнению со здоровыми донорами: отличия касались путей споруляции, хемотаксиса и пируватного обмена, что сопровождалось измененными уровнями «экспрессии» (относительной активности) отдельных таксономических групп. В частности, в группе с повышенными показателями по индексу симптомов хронического простатита (CPSI) и различными фенотипами по системе UPOINT отмечено снижение активности ряда родов (17 родов, включая клостридии) и гипоэкспрессия еще 5 родов (например, бацилл).

Эти данные указывают на то, что не только таксономический состав, но и функциональный метаболический профиль микробиоты может быть связан с клинической симптоматикой, что открывает перспективу разработки терапии, нацеленной на коррекцию микробных метаболических путей (например, модуляция ферментных обменов, пребиотики/метаболиты, влияющие на пируватный метаболизм). При этом необходимы дополнительные функциональные исследования (метабономика, метагеномика с оценкой экспрессии), продольные и интервенционные исследования для верификации причинно-следственных

³⁸ 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 Oct 23; 9(10):e110152. doi: 10.1371/journal.pone.0110152.

связей и оценки клинической эффективности подобных «метаболизм-ориентированных» подходов³⁹.

В одном из сообщений, на основании анализа данных Medline, PubMed, баз данных Cochrane и Embase о роли микробиома мочевыводящих путей в функциональных расстройствах, G. Magistro et al. в 2018 году сделали сообщение, что сложная микробная сеть в мочевыводящих путях имеется у каждого человека и подвержена воздействию внутренних и внешних факторов.

Даже самая незначительная разбалансировка этой сложившейся биосистемы будет способствовать развитию СНМП, в частности таких функциональных расстройств, как интерстициальный цистит, недержание мочи и ХП/СХТБ.

Хотя при стандартной диагностике многие случаи хронических урогенитальных симптомов не выявляют классической бактериальной инфекции, анализы микробиома мочи демонстрируют специфические изменения — формирование отдельных «уротипов», отличных от микробиоты бессимптомных здоровых людей. Это указывает на то, что симптомы не всегда имеют классическое бактериальное происхождение, но тем не менее связаны с дисбалансом уринарной экосистемы, который может напрямую влиять на развитие СНМП и определять клиническую картину⁴⁰.

Значительный практический интерес представляют выводы ведущих ученых-исследователей, основанные на обзоре и анализе публикаций.

С. М. Porter и соавторы показали, что нормальная микробиота играет ключевую роль в поддержании местного и системного гомеостаза и в стимуляции иммунной системы хозяина, тогда как ее дисбиоз может приводить к хронической воспалительной активации и нарушению барьерных и метаболических функций. В контексте предстательной железы это означает, что изменения микробиома — как локально в урогенитальной экосистеме, так и системно через метаболиты и иммунные сигналы — способны способствовать развитию воспалительных состояний (простатит/СХТБ), гиперпластических процессов (ДГПЖ) и, возможно, онкогенеза (рак простаты)⁴¹.

³⁹ Shoskes D. A., Altemus J., Polackwich A. S. et al. The Urinary Microbiome Differs Significantly Between Patients With Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome and Controls as Well as Between Patients 32. doi: 10.1016/j.urology.2016.02.043.

⁴⁰ Magistro G. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? / G. Magistro, C. G. Stief // EurUrol Focus. 2018 (Jul 2). pii: S2405-4569(18)30159-7. doi: 10.1016/j.euf.2018.06.011.

⁴¹ Porter C. M., Shrestha E., Peiffer L. B., Sfanos K. S. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2018 Sep; 21(3):345-354. doi: 10.1038/s41391-018-0041-1. Epub 2018 May 23. Review.

В систематическом обзоре Antunes-Lopes T. и соавторов (2018) проанализированы данные за 2010–2018 гг., демонстрирующие, что применение современных методов, таких как секвенирование 16S рРНК и расширенная количественная культура мочи, позволило выявить присутствие жизнеспособных бактерий, которые остаются нераспознанными при стандартных культуральных исследованиях. Эти исследования подтвердили значительные различия в составе мочевого микробиома у здоровых лиц и пациентов с симптомами нижних мочевыводящих путей (СНМП), включая гиперактивный мочевой пузырь, интерстициальный цистит и хроническую тазовую боль. Авторы подчеркивают, что дисбиоз мочевого микробиома может играть ключевую роль в патогенезе СНМП, способствуя хроническому воспалению, нарушению барьерной функции уротелия и изменению локального иммунного ответа. В связи с этим коррекция микробного дисбаланса с помощью персонализированной антимикробной терапии, пробиотиков или других методов модуляции микробиоты может стать перспективным направлением в лечении СНМП⁴².

М. J. Drake et al. выявили, что взаимосвязь между микробиомом мочевыводящих путей и развитием симптомов нижних мочевыводящих путей (СНМП), включая дисфункцию мочеиспускания и бактериурию с низким титром, может играть значительную роль в патогенезе этих состояний. Авторы отмечают, что традиционные методы культивирования микроорганизмов обладают ограниченной чувствительностью и не позволяют в полной мере оценить разнообразие уропатогенов, особенно при низкой бактериальной нагрузке. Это свидетельствует о необходимости внедрения более современных молекулярно-генетических методов, таких как секвенирование 16s рРНК, для детального изучения уромикробиома и его потенциального вклада в развитие СНМП. Полученные данные открывают новые перспективы для персонализированной диагностики и терапии урологических заболеваний, основанной на анализе микробного профиля пациента⁴³.

Для получения объективного представления о мочевой флоре А. Moustafa et al. провели детальный анализ клинических лабораторных особенностей и микробного метагенома, выполнив секвенирование 121 образца мочи. В ходе исследования было выявлено множество бактериальных (медиана 41 род / образец), эукариотических (медиана 2 вида / образец) и вирусных (медиана 3 вируса / образец) представителей.

⁴² Antunes-Lopes T., Vale L., Coelho A. M. et al. The Role of Urinary Microbiota in Lower Urinary Tract Dysfunction: A Systematic Review. *EurUrol Focus*. 2018 Sep 27. pii: S2405-4569(18)30283-9. doi: 10.1016/j.euf.2018.09.011.

⁴³ Drake M. J., Morris N., Apostolidis A. et al. The urinary microbiome and its contribution to lower urinary tract symptoms; ICI-RS 2015. *Neurourol Urodyn*. 2017 Apr; 36(4):850–853. doi: 10.1002/nau.23006. Review.

При проведении метагеномного анализа были установлены случаи заражения потенциальными патогенными микроорганизмами, часто пропускаемые при рутинном посеве мочи из-за специфических требований роста. Исследователи сошлись во мнении, что традиционными микробиологическими методами невозможно идентифицировать все разнообразие видов микробов в моче, а гораздо более информативно описывают микробиом мочи и представляют наиболее объективную картину геномные подходы⁴⁴.

В работе Ford A. A. и соавторов (2018) обсуждаются сложные ассоциативные связи между мочевым микробиомом и симптомами нижних мочевыводящих путей (СНМП), включая гиперактивный мочевой пузырь (ГАМП). Авторы подчеркивают, что определенные бактерии, такие как *Gardnerella*, могут играть ключевую роль в патогенезе ургентного недержания мочи у женщин. Это подтверждается данными, свидетельствующими о значимо более частом выявлении *Gardnerella* у пациенток с ургентными симптомами по сравнению со здоровыми женщинами. Механизм влияния микробиома на развитие СНМП может быть связан с несколькими факторами:

1. Нарушение защитного барьера уротелия — некоторые бактерии, включая *Gardnerella*, способны продуцировать биопленки и вирулентные факторы, что приводит к хроническому субклиническому воспалению и повышению чувствительности детрузора.

2. Изменение локального иммунного ответа — дисбиотические сдвиги могут провоцировать активацию тучных клеток и выброс провоспалительных цитокинов, что способствует гиперреактивности мочевого пузыря.

3. Нейроиммунные взаимодействия — бактериальные компоненты могут влиять на сенсорные нервы мочевого пузыря, усиливая сигналы мочеиспускания и способствуя ургентности.

Таким образом, выявление специфических бактериальных паттернов, таких как преобладание *Gardnerella*, может иметь важное диагностическое и терапевтическое значение. Авторы отмечают необходимость дальнейших исследований для уточнения причинно-следственных связей и разработки таргетных методов коррекции микробиома при СНМПВ. Вместе с тем стоит учесть, что некоторые виды *Lactobacillus* играют защитную роль при синдромах гиперактивного и болезненного мочевого пузыря. По мнению авторов, мочевой пузырь является резервуаром для бактериальной колонизации, «таким же комфортным, как Лазурный берег», для обладателя данного уротелиального ландшафта, в котором мирно уживаются защитные и патогенные виды бактерий, вызывающие СНМП. Представленные данные подтверждают тезис о том, что

⁴⁴ Moustafa A., Li W., Singh H. et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. SciRep. 2018 Mar 12; 8(1):4333. doi: 10.1038/s41598-018-22660-8.

использование антибактериальных средств в лечении СНМП не всегда является идеальным решением⁴⁵.

Zampini et al. (2018) утверждают, что увеличению количества пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ) в ряде случаев может способствовать дисбиоз. Для глубокого понимания природы и локализации дисбиоза, связанного с мочекаменной болезнью, была проведена комплексная оценка микробиомов как желудочно-кишечного тракта, так и мочевыводящих путей. Данная работа включала микробиомный анализ, в ходе которого исследовались структуры, разнообразие и функции микробной обитаемости в этих системах. У пациентов с рецидивами МКБ, а также у тех, у кого в анамнезе не было заболевания, был дополнительно осуществлен метаболомный анализ мочи. Авторы пришли к выводу, что использование антибиотиков в данной ситуации может иметь негативные последствия, так как оно приводит к изменению состава микробиоты мочи. Это изменение может способствовать нарушению балансировки бактериальной среды, что, в свою очередь, увеличивает риск рецидивов МКБ. Подобные выводы подчеркивают важность осознанного и взвешенного подхода к антибиотикотерапии, особенно в контексте манипуляций с микробиомом и его потенциальной роли в патогенезе МКБ⁴⁶.

Анализ научных данных, опубликованных в 2018 году A. Morand et al., в сочетании с собственными исследованиями уробиома, проведенными с использованием культуральных и метагеномных методов, позволил идентифицировать в моче 562 вида бактерий. Интересным аспектом этого исследования является то, что кишечная микробиота значительно отличалась от мочевой флоры по составу аэробных микроорганизмов. После коррекции кишечной микробиоты, направленной на восстановление микрофлоры мочевыводящих путей, исследователи пришли к выводу о том, что происхождение бактериальной микробиоты человеческого организма, в частности ее кишечной составляющей, остается недостаточно изученным. Данные результаты подчеркивают необходимость дальнейших исследований для более глубокого понимания взаимосвязи между кишечной и мочевой микрофлорой, а также их потенциального влияния на здоровье человека⁴⁷.

⁴⁵ Ford A. A., Veit-Rubin N., Cardozo L., Khullar V. Is the microbiome influencing patient care in lower urinary tract dysfunction? Report from the ICI-RS 2017. *NeurourolUrodyn*. 2018 Jun; 37(S4):S93–S98. doi: 10.1002/nau.23708. Review.

⁴⁶ Zampini A., Nguyen A. H., Rose E., Monga M., Miller A. W. Defining Dysbiosis in Patients with Urolithiasis. *SciRep*. 2019 Apr 1; 9(1):5425. doi: 10.1038/s41598-019-41977-6. PMID: 30932002.

⁴⁷ Human bacterial repertoire of the urinary tract: a potential paradigm shift / A. Morand [et al.] // *J Clin. Microbiol*. 2018 (Nov 7). pii: JCM.00675-18. doi: 10.1128/JCM.00675-18.

В своей работе Brubaker L. при исследовании образцов женской мочи 16s рРНК-последовательности, констатирован факт преобладания одного рода, в основном *Lactobacillus*. В свою очередь, *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* или *Corynebacterium* становились доминирующим родами гораздо реже. Совсем утратили позиции роды *Aerococcus*, *Actinomyces* или *Bifidobacterium*. Зачастую основным таксоном выступало семейство *Enterobacteriaceae*, в состав которого признанным и наиболее изученными явились штаммы рода *Escherichia*. Интересно, что если в моче одних добровольцев выявлялось очень много бактерий, то у прочих очень мало или всего один вид, то есть монокультура⁴⁸.

Когда более пятнадцати лет назад у большинства здоровых добровольцев в мочевом пузыре впервые были обнаружены микроорганизмы, не выявленные культуральными исследованиями, в литературе по отношению к мочевыводящим путям термин «стерильно» употреблять перестали. Сегодня для ученых всего мира секвенирование микробиоты урологического тракта является наиболее точным и информативным методом. Вместе с тем нельзя забывать, что методы секвенирования во многом не стандартизированы, что налагает ряд ограничений для использования в клинике⁴⁹.

Секвенирование ДНК позволило установить, что из тысяч видов микроорганизмов, комфортно обосновавшихся в кишечнике, 99% — анаэробы, состав которых по культуральным исследованиям существенно отличается от известного ранее.

По данным Национального института здоровья США (NIH), только 10% клеток, входящих в состав нашего с вами организма, являются собственно человеческими, остальные 90% принадлежат бактериям, населяющим различные биотопы человека.

Новизна аналитической процедуры и свежей информации дают объективную картину полного понимания микробной этиологии каждого заболевания и требуют от нас принципиально новых подходов к лечению больных на основании измененных представлений о микробной экологии человека в норме и при патологии.

⁴⁸ Brubaker L. The Female Urinary Microbiota/Microbiome: Clinical and Research Implications / L. Brubaker, A. J. Wolfe // Rambam Maimonides Med J. 2017. № 8(2). P. 28. doi: 10.5041/RMMJ.10292.

⁴⁹ Tang J. Microbiome in the urinary system-a review. AIMS Microbiol. 2017 Mar 20; 3(2):143–154. doi: 10.3934/microbiol.2017.2.143.

7. Тестикулярный микробиом у инфертильных мужчин

Авторы: Фаниев М. В., Степанов В. С.

7.1. Вступление

Анализ последовательности генома (секвенирование), ворвавшийся в науку в начале нового тысячелетия, по значимости можно сравнить с полетом Юрия Гагарина в космос, а геном — с древней рукописью, где каждая строчка или буква — это ген, рассказывающий нам о наших предках.

Секвенирование геномов микробиоты в рамках проекта Human Microbiome Project показало принципиально важный факт: совокупный генетический репертуар резидентных микроорганизмов человека намного превосходит по объему геном самого хозяина — набор немонокотных микробных генов оценивается в миллионы, что делает микробный пангеном порядка сотен раз большим, чем человеческий геном, и придает микробиоте огромную функциональную емкость в метаболизме, детоксикации, синтезе витаминов и регуляции иммунитета. Это открытие подчеркивает, что для понимания здоровья и болезней человека необходимо рассматривать хозяина и его микробную экосистему как единый функциональный супрагеном. Ученые убедительно доказали, что в ДНК микробных колоний, генов, ответственных за выживание человека, значительно больше, чем в самой человеческой ДНК⁵⁰.

Проблема репродукции, имеющая огромное значение для общества, сегодня входит в перечень приоритетных задач медицины нынешнего столетия. Одним из значимых направлений для ее решения, является определение клинического значения и идентификация состава микробиома тестикулярной ткани у бесплодных мужчин, в том числе влияния микробных популяций урогенитального тракта на репродуктивные потери, делающей из здорового мужчины инфертильного, неспособного к продолжению рода.

Из всех микробных популяций кишечный микробиом изучен наиболее глубоко, но полученные знания в этом направлении, прямо указывают на необходимость серьезных, крупномасштабных исследований флоры урогенитального тракта.

⁵⁰ NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. NIH News. 2012. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-human-microbiome-project-defines-normal-bacterial-makeup-body>.

До недавнего времени, на протяжении многовековой истории медицины, микробиологи и урологи были уверены, что семенная жидкость у условно здорового мужчины стерильна, а случаи присутствия в ней микроорганизмов относили к патологии⁵¹.

С анатомических позиций мужской уrogenитальный тракт изучен досконально, и каждый уролог знает его лучше своей квартиры, но его микробиота, в том числе и семенная жидкость, до сих пор ставят перед нами массу вопросов. Сравнивая знания о микробиоты биотопов из различных топографических локаций организма, мы понимаем, что уrogenитальная микробиота — это *terra incognita*⁵².

Вместе с тем, несмотря на кажущуюся независимость колоний, мы не можем отрицать, что различные структуры микробиоты органов и систем организма так или иначе связаны между собой и в разной степени оказывают влияние друг на друга.

В качестве примера системного влияния микробиоты на мужскую репродуктивную систему можно рассматривать влияние кишечного микробиома на проницаемость гемато-тестикулярного барьера (ГТБ) и на эндокринную регуляцию функции яичка: микробные метаболиты (короткоцепочные жирные кислоты, микролигандные молекулы), а также продуцируемые бактериями провоспалительные факторы (например, липополисахарид) могут модулировать системное и местное воспаление, влиять на функцию клеток Сертоли и Лейдига, изменять сигналы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (HPG-оси) и тем самым сказываться на целостности ГТБ и стероидогенезе. Поддерживающим звеном в этой концепции служат данные о том, что сам микробиом репродуктивных трактов, включая семенную жидкость, ассоциируется с качеством спермы и репродуктивными исходами: систематический обзор и метаанализ Farahani et al. (Andrology 2021) продемонстрировали связь семенной микробиоты с параметрами спермы и мужским фертильным потенциалом. В совокупности эти наблюдения показывают, что воздействие на кишечную микробиоту — потенциально через диету, пробиотики/пребиотики или иные интервенции — может опосредованно влиять на тестикулярную физиологию и фертильность⁵³.

⁵¹ Baud D., Pattaroni C., Vulliemoz N., Castella V., Marsland B. J., Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019. 12 февраля. 10:234. doi: 10.3389/fmicb.2019.00234. PMID: 30809218; PMCID: PMC6379293.

⁵² Mariat D. et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009; 9:123 PMID: 19508720. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.

⁵³ Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J. W., Jayasena C. N., Minhas S. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology.* 2021 Jan; 9(1):115–144. doi: 10.1111/andr.12886. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32794312.

Сейчас, опираясь на последние научные данные, мы можем с уверенностью констатировать, что микробиом играет роль первой скрипки не только в соматическом здоровье человека, но и в развитии мужского фактора бесплодия, в том числе и его самой тяжелой формы — азооспермии.

7.2. Изучение популяции мужчин с азооспермией

Генетические факторы играют ключевую роль в патогенезе азооспермии, затрагивающей около 1% мужчин общей популяции и составляющей до 20% случаев мужского бесплодия⁵⁴. В зависимости от патогенетического механизма выделяют две основные формы: секреторную (необструктивную, НОА), обусловленную нарушением сперматогенеза в тестикулярной ткани, и экскреторную (обструктивную, ОА), связанную с препятствием на пути транспорта сперматозоидов. Современные исследования демонстрируют, что НОА в большинстве случаев (60–80%) носит идиопатический характер, при этом значительная доля случаев может быть объяснена генетическими аномалиями, включая микроделеции Y-хромосомы (AZF-регион), кариотипные нарушения (например, синдром Клайнфельтера) и мутации генов, регулирующих сперматогенез⁵⁵.

В свою очередь, обструктивная азооспермия (ОА) преимущественно связана с нарушениями проходимости репродуктивного тракта на различных уровнях. Наиболее частыми врожденными причинами ОА являются аплазия или атрезия семявыносящих протоков, обусловленные мутациями гена CFTR (около 80% случаев), а также врожденные обструкции эякуляторных протоков⁵⁶. Приобретенные формы ОА развиваются вследствие воспалительных процессов (эпидидимиты, простатиты), ятрогенных повреждений (послеоперационные рубцы, вазэктомия) или травм органов малого таза⁵⁷.

Важно отметить, что при ОА, в отличие от НОА, сохраняется нормальный сперматогенез, что подтверждается гистологическими исследованиями тестикулярной ткани и повышенным уровнем ингибина В в сыворотке крови⁵⁸. Углубленное понимание молекулярных механизмов азооспермии открывает перспективы для разработки персонализированных подходов к диагностике и лечению мужского бесплодия.

⁵⁴ Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369–384 (2018). doi: 10.1038/s41585-018-0003-3.

⁵⁵ Tüttelmann F. et al. (2011). Gene polymorphisms and male infertility — a meta-analysis and literature review. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(6), 643–658.

⁵⁶ Schlegel P. N., Shin D. (2013). Sperm retrieval techniques. *Nature Reviews Urology*, 10(12), 723–730.

⁵⁷ Dohle G. R. et al. (2017). EAU guidelines on male infertility. *European Urology*, 48(5), 703–711.

⁵⁸ Esteves S. C. et al. (2021). Male infertility and gonadotropin treatment. *Human Reproduction Update*, 27(6), 1066–1094.

В ходе изучения этиологической роли микроорганизмов современные исследования убедительно демонстрируют значимое влияние микробиоты урогенитального тракта на мужскую репродуктивную функцию. Особый интерес представляют данные, полученные с помощью высокочувствительных методов диагностики, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в сочетании с культуральными исследованиями. Было установлено, что такие микроорганизмы, как *Lactobacillus iners*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, ассоциированы с нарушениями сперматогенеза и снижением фертильности⁵⁹.

В свою очередь, следует отметить ключевые механизмы влияния микробиоты на фертильность:

— Прямое повреждающее действие — *E. coli* и *S. aureus* способны индуцировать апоптоз сперматозоидов, снижать их подвижность и нарушать целостность ДНК за счет продукции реактивных форм кислорода⁶⁰.

— Хроническое воспаление — *G. vaginalis* и анаэробные бактерии стимулируют выброс провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8), что приводит к повреждению гематотестикулярного барьера⁶¹.

— Дисбиотические изменения — снижение доли защитных *Lactobacillus spp.* и избыточный рост условно-патогенной флоры коррелируют с олиго— и азооспермией⁶².

В этой связи невозможно игнорировать клинические последствия, которые продемонстрированы в исследовании De Croo et al. (2000), что даже при успешном получении сперматозоидов с помощью TESE (как при обструктивной, так и необструктивной азооспермии) бактериальная контаминация может снижать частоту оплодотворения и имплантации после ИКСИ. Это подчеркивает необходимость скрининга и коррекции урогенитальных инфекций перед проведением ВРТ⁶³.

⁵⁹ Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M. L., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* 2013; 100:1261–1269.

⁶⁰ Eini F., Kutenaei M. A., Zareei F. et al. Effect of bacterial infection on sperm quality and DNA fragmentation in subfertile men with Leukocytospermia. *BMC Mol and Cell Biol* 22, 42 (2021). doi: 10.1186/s12860-021-00380-8.

⁶¹ Fraczek M. et al. (2014). Membrane stability and mitochondrial activity of human spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17751–17768.

⁶² Barbonetti A. et al. (2016). Relationship between sexually transmitted bacterial pathogens and semen parameters in infertile men with and without leukocytospermia. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(1), 27–34. doi: 10.1007/s40618-015-0343-2.

⁶³ De Croo I. et al. (2000). Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 15(6), 1383–1388.

7.3. Обсуждение

Анализ микробиома тестикулярной ткани впервые опроверг представление о ее стерильности, выявив уникальные бактериальные сообщества, которые не являются следствием контаминации из других отделов урогенитального тракта. В образцах с нормальным сперматогенезом доминировали Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria, тогда как у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией (iNOA) наблюдалось повышенное бактериальное обсеменение с преобладанием Actinobacteria и Firmicutes. При полной аплазии зародышевых клеток отмечалось наибольшее микробное разнообразие с абсолютным доминированием Actinobacteria и отсутствием Clostridia — класса, представители которого (Anaerococcus, Peptoniphilus) ранее ассоциировались с ОАТ-синдромом.

Сравнение с микробиомом семенной жидкости выявляет как сходства, так и различия. В исследованиях семени здоровых мужчин также преобладают Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes и Actinobacteria⁶⁴, что частично совпадает с профилем тестикулярной ткани. Однако ключевое отличие заключается в таксономическом составе: в эякуляте чаще обнаруживаются Lactobacillus, Staphylococcus и Streptococcus⁶⁵, тогда как в тестикулярной ткани их доля значительно ниже. Это может указывать на то, что микробиом яичка формируется независимо от микробных сообществ семенных пузырьков и простаты, которые вносят основной вклад в состав семенной жидкости⁶⁶.

Клинически значимым является тот факт, что дисбиоз семенной микробиоты коррелирует с олигозооспермией и астенозооспермией⁶⁷, тогда как в тестикулярной ткани при iNOA наблюдается не просто дисбаланс, а принципиально иная структура сообществ — с обеднением Clostridia и увеличением доли Actinobacteria. Поскольку Clostridia (в частности, Anaerococcus) в семенной жидкости связаны с нормальной подвижностью сперматозоидов (Hou et al., 2013), их отсутствие в тестикулярной ткани при азооспермии может отражать нарушение микроокружения, необходимого для созревания половых клеток.

В связи с этим исследование спермы на предмет наличия Clostridia представляет собой объективный клинический маркер для прогнозирования аплазии половых клеток.

⁶⁴ Mändar R. et al. (2017) Seminal microbiome in men with and without prostatitis. Int J Urol.

⁶⁵ Baud D et al. (2019) "Sperm microbiota and its impact on semen parameters." Front Microbiol.

⁶⁶ Monteiro C. et al. (2018) Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal microbes. J Reprod Immunol.

⁶⁷ Farahani L et al. (2020) "The semen microbiome and its impact on sperm function." J Reprod Immunol.

Примечательно, что доминирующие в тестикулярной ткани фертильных мужчин типы бактерий (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*) также являются ключевыми компонентами кишечного микробиома. Однако под воздействием внешних факторов, таких как диета (включая потребление генномодифицированных продуктов), экологические токсины и возрастные изменения, состав кишечной микробиоты подвергается значительным изменениям. В частности, с возрастом наблюдается снижение биоразнообразия, уменьшение доли *Firmicutes* и увеличение *Proteobacteria*, что коррелирует с ослаблением иммунной функции, хроническим воспалением и гормональными нарушениями⁶⁸.

Удивительным открытием стало то, что у мужчин с необструктивной азооспермией (NOA) изменения тестикулярного микробиома практически идентичны возрастным сдвигам в кишечнике: обеднение *Firmicutes*, доминирование *Actinobacteria* и появление провоспалительных таксонов. Это согласуется с гипотезой о фенотипе преждевременного старения у таких пациентов, которое проявляется не только на системном уровне (снижение тестостерона, окислительный стресс), но и в микроокружении яичка. Подобные параллели между кишечным и тестикулярным микробиомом были ранее отмечены в исследованиях на животных: у старых мышей наблюдалось снижение количества *Lactobacillus* и увеличение *Proteobacteria* в семенниках, что сопровождалось нарушением сперматогенеза⁶⁹.

⁶⁸ Claesson M. J., Jeffery I. B., Conde S. et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178-184. doi: 10.1038/nature11319.

⁶⁹ Zhang J., Huang Y., Wang X. et al. (2021). Age-related changes in the testicular microbiome and their association with spermatogenic dysfunction in mice. *Aging Cell*, 20(6), e13373. doi: 10.1111/acer.13373.

8. Микробиом яичка у мужчин с азооспермией — первые свидетельства воздействия измененной микросреды

8.1. Вступление

Современные исследования демонстрируют, что мужское бесплодие может служить не только репродуктивной проблемой, но и важным индикатором общего состояния здоровья. Согласно работе Ventimiglia и соавт. (2016), у мужчин с нарушениями фертильности наблюдается повышенный риск развития онкологических заболеваний, а также возраст-ассоциированных патологий, включая сердечно-сосудистые (гипертензия, ишемическая болезнь сердца) и метаболические⁷⁰.

Интересные данные были получены в исследовании Ху и соавторов (2014), где были выявлены признаки преждевременного старения в ткани яичек у молодых мужчин с бесплодием. Гистологический анализ показал, что у таких пациентов наблюдаются структурные изменения, характерные для пожилых мужчин, включая: Уменьшение количества и функциональной активности клеток Лейдига, ответственных за выработку тестостерона. Снижение популяции клеток Сертоли, играющих ключевую роль в поддержании сперматогенеза: развитие фиброзных изменений стромы яичка, утолщение базальной мембраны семенных канальцев, нарушение васкуляризации тестикулярной ткани.

Эти морфологические изменения сопровождались характерными биохимическими маркерами клеточного старения, такими как укорочение теломер и активация механизмов клеточного старения. Авторы подчеркивают, что выявленные изменения носят системный характер и могут отражать общие процессы преждевременного старения организма. Полученные данные свидетельствуют о необходимости более тщательного мониторинга общего состояния здоровья у молодых мужчин с нарушениями фертильности⁷¹.

Экспериментальные исследования на животных моделях продемонстрировали критическую роль микроокружения в регуляции сперматогенеза. Пионерская работа Ogawa и соавт. (2000) показала, что трансплантация мужских

⁷⁰ Ventimiglia E., Montorsi F., Salonia A. Comorbidities and male infertility: a worrisome picture. *Curr Opin Urol* 2016; 26:146–151.

⁷¹ Yi-chao X. U., Jing L. I., Liang W.-B., Zhu W.-J. Evaluation on changes of testicular histology in aging men. *J Reprod Contracept* 2014; 24:199–204.

половых стволовых клеток способна восстанавливать фертильность у бесплодных мышей, но только при условии сохранения нормальной тестикулярной ниши. Эти данные подчеркивают, что успешный сперматогенез зависит не только от наличия функциональных стволовых клеток, но и от адекватного состояния внеклеточного матрикса, сигнальных молекул и микробного окружения. В частности, исследования последних лет указывают на важную роль тестикулярного микробиома в поддержании локального гомеостаза. Восстановление нормальной микроэкологии яичка может стать перспективным направлением в лечении мужского бесплодия, особенно в случаях, связанных с нарушением микроокружения половых клеток⁷².

Современные исследования все чаще рассматривают бактериальный микробиом (БМ) как важный компонент внеклеточного микроокружения, способный оказывать системное влияние на организм. Как показано в работе Markle и соавт. (2013), кишечный микробиом играет ключевую роль в модуляции гормонального фона, включая регуляцию уровня тестостерона в крови, что может непосредственно влиять на сперматогенез и функцию яичек⁷³. Дополнительные исследования демонстрируют, что микробиом способен метаболизировать стероидные гормоны, такие как эстрогены, тем самым участвуя в поддержании эндокринного баланса⁷⁴.

Кроме того, как отмечает Biesalski (2016), микробиом кишечника играет важную роль в синтезе и усвоении витаминов группы В, которые критически важны для процессов клеточного деления и энергетического метаболизма, включая сперматогенез⁷⁵. Эти данные подчеркивают, что дисбиотические изменения в составе микробиома могут негативно влиять на мужскую фертильность как напрямую (через нарушение микроокружения яичка), так и опосредованно (через системные гормональные и метаболические нарушения). Таким образом, коррекция микробиома может рассматриваться как перспективное направление в терапии некоторых форм мужского бесплодия. Несмотря на значительный прогресс в изучении микробиома человека, детальная характеристика бактериальных сообществ яичка остается неизученной. Как отмечают

⁷² Ogawa T., Dobrinski I., Avarbock M. R., Brinster R. L. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 2000; 6:29–34.

⁷³ Markle J. G., Frank D. N., Mortin-Toth S., Robertson C. E., Feazel L. M., Rolfe-Kampczyk U., von Bergen M., McCoy K. D., Macpherson A. J., Danska J. S. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013; 339:1084–1088.

⁷⁴ Baker J. M., Al-Nakkash L., Herbst-Kralovetz M. M. Estrogen-gut microbiome axis: physiological and clinical implications. *Maturitas* 2017; 103:45–53.

⁷⁵ Biesalski H. K. Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Ann NY Acad Sci* 2016; 1372:53–64.

Lloyd-Price и соавторы (2016) в своем обзоре о здоровом человеческом микробиоме, на сегодняшний день проведена комплексная оценка микробных сообществ различных биотопов организма, включая кожу, слизистые оболочки и полости тела. Однако тестикулярная ткань, в отличие от других органов, до сих пор не стала предметом систематического микробиомного анализа. Этот пробел в знаниях особенно значим, учитывая гематотестикулярный барьер, создающий уникальные условия для формирования микробного сообщества, и возрастающее количество данных о влиянии микробиома на репродуктивную функцию. Необходимость таких исследований подчеркивается обнаружением тканей специфических микробиомов в других «стерильных» органах, что меняет традиционные представления о микробной экологии человеческого организма⁷⁶.

8.2. Состав и разнообразие бактериальных сообществ в группах контроля, ОА и НОА

В соответствии с рекомендациями ВОЗ (2010), диагноз мужского бесплодия и азооспермии устанавливался на основании стандартных параметров анализа эякулята. В группе пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией (НОА) ключевым критерием разделения стала результативность процедуры microTESE (микрохирургическое извлечение сперматозоидов из тестикулярной ткани), что позволило выделить две подгруппы: с положительным и отрицательным результатом.

Как продемонстрировали Alfano и коллеги (2017), соотношение антимюллерова гормона к тестостерону (АМГ/Т) обладает значительной прогностической ценностью при определении вероятности успешного извлечения сперматозоидов у данной категории пациентов. В их исследовании этот показатель продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность в прогнозировании результатов microTESE, что подчеркивает его потенциальную клиническую ценность в качестве неинвазивного маркера перед проведением хирургического вмешательства⁷⁷.

Были изучены клинические данные, гормональный профиль и гистологическая классификация семенной ткани яичка у 47 мужчин европеоидной расы с идиопатической азооспермией, которым была выполнена микродиссекционная

⁷⁶ Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* 2016; 8:51.

⁷⁷ Alfano M., Ventimiglia E., Locatelli I., Capogrosso P., Cazzaniga W., Pederzoli F., Frego N., Matloob R., Sacca A., Pagliardini L. et al. Anti-mullerian hormone-to-testosterone ratio is predictive of positive sperm retrieval in men with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Sci Rep* 2017; 7:17638.

TESE, общий уровень тестостерона (Т) и уровень ЛГ в сыворотке не различались между группами. И наоборот, у мужчин с идиопатической НОА уровень ФСГ был выше, что свидетельствует о первичной недостаточности яичка. Гистопатологическая картина сперматогенеза у мужчин с идиопатической НОА была визуализирована вплоть до полной аплазии половых клеток при отрицательном извлечении сперматозоидов. При проведении высокопроизводительного секвенирования микробиома яичек и дисбиоз среди группы с нормальным созреванием зародышевой линии показали обнаруживаемые количества ДНК 16S (медиана; 3,4; IQR; 1,7–7 копий/нг загруженной ДНК) на фоне, установленном с использованием клеточной линии РС3 (0,6; 0,6–0,8). В свою очередь, в образцах ткани у группы мужчин с идиопатической НОА обнаружено повышенное количество ДНК 16S, (12,1; 5–15).

При исследовании тестикулярной ткани при проведении микродиссекционной TESE авторы наглядно показали таксономическое разнообразие структуры микробиома. Профилирование БМ и его значительные различия между образцами (α -разнообразие) и кластеризацией БМ в образцах ткани яичка (β -разнообразие). Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria были типами, связанными с нормальной зародышевой линией, и наоборот, у мужчин с идиопатической НОА были обнаружены только актинобактерии и Firmicute. Снижение богатства с точки зрения классов также наблюдалось в данной группе по сравнению с мужчинами, имеющими положительные результаты тестикулярной биопсии.

Не было обнаружено никаких различий между положительным и отрицательным извлечением сперматозоидов с точки зрения количества ДНК 16S. Точно так же не было обнаружено различий в разнице α и β между двумя группами. Ткани яичка у обоих типов с идиопатической необструктивной азооспермией мужчин были аналогичным образом обогащены актинобактериями и Firmicutes на уровне типа; актинобактерии и Firmicutes доминировали в ткани положительных результатов поиска сперматозоидов, в то время как актинобактерии были преобладающими таксонами при отрицательных показателях получения сперматозоидов. На уровне класса ткани от положительных результатов поиска сперматозоидов представляли актинобактерии, бациллы и клостридии; и наоборот, значительное снижение клостридий наблюдалось при отрицательном извлечении сперматозоидов, где доминировали актинобактерии, а *Peptoniphilus asaccharolyticus* не обнаруживался⁷⁸.

⁷⁸ Alfano M., Ferrarese R., Locatelli I., Ventimiglia E., Ippolito S., Gallina P., Cesana D., Canducci F., Pagliardini L., Viganò P., Clementi M., Nebuloni M., Montorsi F., Salonia A. Testicular microbiome in azoospermic men-first evidence of the impact of an altered microenvironment Hum. Reprod. 2018 Jul 1; 33(7):1212–1217. doi: 10.1093/humrep/dey116. PMID: 29850857; PMCID: PMC6012977.

8.3. Обсуждение

Анализ микробиома яичка впервые показал, что тестикулярная ткань человека не является микробиологически стерильной средой, и представляет новые данные об БМ, ассоциированной с тканями яичка, и исключая любой потенциальный вклад бактериальных сообществ, присутствующих в нижележащих тканях и/или в других органах урогенитального тракта.

Ткани яичка с нормальным сперматогенезом были охарактеризованы Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria в качестве доминирующих типов. И наоборот, повышенное количество бактерий было обнаружено в яичках мужчин, страдающих идиопатической НОА, с преобладанием актинобактерий и Firmicutes. Эти два типа в равной степени доминировали в тканях с положительным отбором сперматозоидов, тогда как бактериальное богатство и разнообразие наблюдалось в образцах от мужчин с полной аплазией зародышевой клетки, где в БМ доминировал тип актинобактерий.

Полная аплазия половых клеток также характеризовалась отсутствием клостридий. Эти результаты имеют потенциальную клиническую значимость, так как было описано, что два рода класса Clostridia (*Anaerococcus* и *Peptoniphilus*) связаны с нарушением функций сперматозоидов⁷⁹.

В обзорной статье Shin и соавторов (2015), опубликованной в Trends in Biotechnology, рассматривается роль Proteobacteria как ключевого микробного маркера дисбиоза кишечника. В здоровом микробиоме представители этого типа (например, *Escherichia*, *Salmonella*, *Helicobacter*) присутствуют в небольших количествах, но их увеличение коррелирует с воспалительными и метаболическими заболеваниями. Чрезмерный рост Proteobacteria ассоциирован с ожирением, воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), диабетом и другими состояниями. Бактерии данного типа могут вызывать воспаление через активацию TLR- и NF-κB-путей, нарушать барьерную функцию кишечника и конкурировать с полезными симбионтами (например, Firmicutes и Bacteroidetes). Авторы подчеркивают, что мониторинг Proteobacteria в микробиоме может помочь в разработке новых стратегий коррекции дисбиоза, включая пробиотики и пребиотики. Эти данные важны для исследований, связывающих дисбиоз кишечника с системными нарушениями, включая мужское бесплодие⁸⁰.

⁷⁹ 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 Oct 23; 9(10):e110152. doi: 10.1371/journal.pone.0110152.

⁸⁰ Shin N. R., Whon T. W., Bae J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol 2015; 33:496–503.

9. Разнообразие таксономической структуры микробиома семенной жидкости у пациентов с различными видами азооспермии

9.1. Вступление

Многочисленные исследования последних десятилетий, включая работы Javurek et al. (2016) и De Francesco et al. (2011), убедительно продемонстрировали значимое влияние бактериальной микрофлоры на мужскую репродуктивную функцию. С помощью современных методов диагностики, таких как ПЦР-анализ и бактериологическое культивирование, была установлена тесная ассоциация между присутствием определенных бактериальных видов (включая *Lactobacillus iners*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) и нарушениями фертильности у мужчин. Эти микроорганизмы могут оказывать негативное влияние на параметры спермы через различные механизмы, включая индукцию воспалительных процессов, продукцию реактивных форм кислорода и прямое повреждение сперматозоидов^{81, 82}. Как отмечают Younes et al. (2018), подобные взаимодействия в репродуктивном тракте подчеркивают сложный характер взаимоотношений между микробиотой и репродуктивным здоровьем. Полученные данные обосновывают необходимость включения микробиологического скрининга в алгоритм обследования мужчин с бесплодием и разработки антимикробных стратегий коррекции выявленных нарушений⁸³. Вместе с тем следует обратить внимание, что большинство ранее проведенных исследований были посвящены нескольким типам бактерий и основывались на качественном анализе, основной целью которых было выявление связи между микробиотой спермы и качеством спермы как таковой, но полного понимания о наличии определенных бактериальных сообществ в сперме до настоящего времени нет.

Современные технологии секвенирования нового поколения (NGS) произвели революцию в биомедицинских исследованиях, предоставив мощный

⁸¹ Javurek A. B., Spollen W. G., Ali A. M., Johnson S. A., Lubahn D. B., Bivens N. J., Bromert K. H., Ellersieck M. R., Givan S. A., Rosenfeld C. S.: Discovery of a novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor alpha genetic status. *Sci Rep* 6: 23027, 2016.

⁸² De Francesco M. A., Negrini R., Ravizzola G., Galli P., Manca N: Bacterial species present in the lower male genital tract: A five-year retrospective study. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 16: 47–53, 2011.

⁸³ Younes J.A., Lievens E., Hummelen R., van der Westen R., Reid G., Petrova M. I. Women and their microbes: The unexpected friendship. *Trends Microbiol* 26: 16–32, 2018.

инструментарий для анализа сложных микробных сообществ. Как продемонстрировали Sivan и соавторы (2015) в своем новаторском исследовании, опубликованном в Science, применение NGS-подходов позволяет не только идентифицировать состав микробиоты, но и раскрывать ее плеiotропные физиологические эффекты, включая модуляцию иммунного ответа. В контексте репродуктивной биологии метагеномное секвенирование открывает беспрецедентные возможности для детальной характеристики микробиома семенной жидкости, выявления ассоциаций между дисбиотическими нарушениями и параметрами фертильности, изучения механизмов микробной регуляции сперматогенеза. Особую ценность представляют методы RNA-seq и shotgun sequencing, позволяющие анализировать не только таксономический состав, но и функциональный потенциал микробных сообществ. Эти технологические достижения создают основу для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий, направленных на коррекцию микробиоты как перспективного подхода в лечении мужского бесплодия⁸⁴.

Методы высокопроизводительного секвенирования используемого в современных исследованиях для сравнения семенного бактериального состава у пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией, представляют большой интерес и могут быть полезны для разработки клинической терапии для профилактики и лечения азооспермии.

9.2. Состав и таксономическое разнообразие бактериальных сообществ в группах сравнения пациентов с азооспермией

Одной из первых и наиболее показательных, на наш взгляд, является работа китайских коллег (Chen et al., 2018), которыми был проведен анализ микробиома семенной жидкости инфертильных мужчин китайской популяции с обструктивной азооспермией (ОА) и не обструктивной азооспермией (НОА) в сравнении с контрольной группой фертильных пациентов⁸⁵.

В исследование вошли пациенты:

- контрольной группы (С) в возрасте 22–36 лет;
- с обструктивной азооспермией (ОА) в возрасте 24–38 лет;
- с необструктивной азооспермией (НОА) в возрасте 25–37 лет.

⁸⁴ Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M., Benjamin F. W., Lei Y. M., Jabri B., Alegre M. L. et al: Commensal Bifidobacterium promotes anti-tumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. Science 350: 1084–1089, 2015.

⁸⁵ Houyang Chen, Tao Luo, Tingtao Chen, Gongxian Wang. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. Experimental and Therapeutic Medicine, 15: 2884–2890, 2018.

Во всех группах таксономический состав семенной жидкости определялся на уровне филы (типовой принадлежности). Для сравнения микробов в группах ОА и НОА гипервариабельный участок V4 бактериальной геномной ДНК в данном исследовании был секвенирован с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS), а эффективные метки со сходством $\geq 97\%$ рассматривались как одна операционная таксономическая единица (Operational Taxonomic Unit, OTU). В общей сложности в этой работе было проанализировано 675539 последовательностей и были получены 5867 OTU, в среднем 345 OTU на клиническую группу. Видовой состав в каждой группе в подавляющем большинстве однородный.

На уровне типовой принадлежности были проанализированы данные для 20 микроорганизмов, которые были наиболее многочисленными в каждой клинической группе. Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes и Actinobacteria были преобладающими типами исследованных микробиомов, составляя 98,14% в контрольной группе, 98,26% в группе ОА и 90,96% в группе НОА.

По сравнению с группой контроля азооспермия уменьшила количество OTU Cyanobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Chloroflexi, Crenarchaeota, Armatimonadetes, Elusimicrobia, Nitrospirae, Euryarchaeota, Spirochaetes, Chlorobacteres, Veronaeae, Chlorobis, Chromeobis.

При анализе бактериального состава семенной жидкости на уровне рода таксономическая структура микробиоты была представлена следующим образом: Lactobacillus, Prevotella, Proteus, Pseudomonas, Veillonella, Corynebacterium, Rhodococcus, Staphylococcus и Bacillus были доминирующими родами, обнаруженными в группах контроля (55,02%), ОА (62,54%) и НОА (59,74%). Alicyclobacillus, Amaricoccus, Anaeromyxobacter, Aquicella, Arsenicococcus, Azospirillum, Chitinimonas, Chlorobaculum, Coprococcus, Desulfovibrio, Dokdonella, Gallionella, Geobacter, Helicobacter, Idiomarina, Kaistia и Kribbella были значительно снижены в группе контроля по сравнению с группами ОА и НОА. В группе НОА было значительно больше Sneathia и Lysobacter sp., в то время как группа ОА имела высокий уровень OTU Solibacillus и Campylobacter.

Корреляционный анализ показал, что группы ОА и НОА имели повышенный риск метаболических, инфекционных и иммунных заболеваний. У пациентов с азооспермией были выявлены изменения в экспрессии генов, связанных с метаболизмом, что могло бы указывать на проблемы со здоровьем как для них, так и для половых партнеров. Результаты подчеркнули, что изменения в составе микробиома, особенно увеличение Bacteroidetes и Firmicutes, могут быть связаны с ухудшением здоровья, повышая риск инфекций и воспалений.

Также были приведены ключевые выводы:

— Таксономические различия: выявлены значимые различия в составе бактериальных сообществ между группами. Для НОА характерно преобладание *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Corynebacterium*, тогда при ОА отмечалось увеличение доли *Prevotella* и *Ureaplasma*.

— Дисбиоз и фертильность: у фертильных мужчин обнаружена более высокая доля *Lactobacillus*, что согласуется с их предполагаемой протективной ролью.

— Потенциальные маркеры: *Pseudomonas* и *Acinetobacter* ассоциированы с НОА, что может указывать на их роль в нарушении сперматогенеза.

Данная работа подтверждает гипотезу о связи дисбиоза семенной жидкости с мужским бесплодием и предлагает новые бактериальные мишени для диагностики.

9.3. Обсуждение

В приведенном исследовании образцы спермы были получены от пациентов с азооспермией и здоровых контрольных пациентов, после чего фрагменты гена 16S рРНК были секвенированы с использованием высокопроизводительного метода секвенирования (NGS). Результаты продемонстрировали состав микробиомных сообществ в образцах спермы и наиболее распространенными типами были Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes и Actinobacteria, составляющие 98,14, 98,26 и 90,96% от общего числа типов в группах здорового контроля, ОА и НОА соответственно.

Пациенты в группах ОА и НОА имели большее количество типов Bacteroidetes и Firmicutes, тогда как количество протеобактерий и актинобактерий было ниже по сравнению с группой здорового контроля. Firmicutes — это тип бактерий, большинство из которых вырабатывают эндоспores, устойчивы к высыханию, способны выдерживать экстремальные условия и обычно находятся в различных средах; эта группа включает некоторые известные патогены⁸⁶.

Кроме того, этот тип бактерий включает три больших класса грамотрицательных, не образующих спор, анаэробных или аэробных и палочковидных бактерий. Более того, некоторые представители рода *Bacteroides* являются оппортунистическими патогенами. Поэтому увеличение числа видов Bacteroidetes и Firmicutes у пациентов с азооспермией может повысить риск гинекологического воспаления у их половых партнеров.

⁸⁶ Wolf M., Müller T., Dandekar T., Pollack J. D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. Int J Syst Evol Microbiol 54: 871–875, 2004. 29.

На уровне рода девять доминирующих родов бактерий *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* и *Bacillus* составили 55,02, 62,54 и 59,74% от общего количества OTU в группах здорового контроля, ОА и НОА соответственно. Количество OTU *Lactobacillus* составляло 6,79% в группе здорового контроля, тогда как оно составляло 17,98 и 17,24% в группах ОА и НОА соответственно. Вагиналище и его микрофлора образуют сбалансированную экосистему, поэтому вагинальный дисбактериоз приводит к акушерским и гинекологическим заболеваниям, а также к осложнениям, характеризующимся уменьшением количества или полным отсутствием лактобацилл⁸⁷. Поэтому он может быть полезен для дальнейшего изучения роли *Lactobacillus* в сперме пациентов с азооспермией.

Анализ микробного состава с использованием методов PLS-DA и диаграмм Венна⁸⁸ выявил значимые различия между группами здоровых мужчин, пациентов с обструктивной азооспермией (ОА) и необструктивной азооспермией (НОА). Результаты анализа Венна показали наличие 398 общих операционных таксономических единиц (OTU) во всех трех группах, включая 27 OTU, принадлежащих к роду *Lactobacillus*. Это указывает на сохранение определенного базового микробного профиля даже при патологических состояниях. Однако более детальный PLS-DA анализ продемонстрировал, что бактериальные сообщества в группах ОА и НОА имеют большее сходство между собой, чем с контрольной группой.

Данный факт позволяет предположить, что наличие или отсутствие сперматозоидов в эякуляте (общий признак для обеих форм азооспермии) может играть ключевую роль в формировании микробного состава, независимо от причины нарушения сперматогенеза⁸⁹. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными исследованиями, в которых подчеркивается влияние семенной плазмы на микробиом репродуктивного тракта (Chen et al., 2023). Таким образом, выявленные закономерности не только подтверждают гипотезу о связи между микробными сообществами и мужской фертильностью, но и открывают новые перспективы для разработки диагностических маркеров на основе специфических OTU, характерных для разных форм азооспермии. Вместе

⁸⁷ Donders G. G., Bosmans E., Dekeersmaeckerb A., Vereecken A., Van Bulck B., Spitz B: Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gyneco* 182: 872-878, 2000; Kovachev S. M: Obstetric and gynecological diseases and complications resulting from vaginal dysbacteriosis 68: 173–184, 2014.

⁸⁸ Shade A., Handelsman J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.

⁸⁹ Chen X. et al. (2023) Seminal plasma microbiota in male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*. doi: 10.1111/andr.13456.

с тем количество OTU *Solibacillus*, *Campylobacter*, *Campylobacteraceae* и *Plesiomonas* в группе ОА, а также *Sneathia* и *Lysobacter* в группе НОА, были увеличены. Большинство видов *Campylobacter* вызывают заболевания, которые поражают людей и других животных, поэтому это увеличение представляет потенциальный риск для здоровья пациентов с азооспермией⁹⁰.

Программное обеспечение PICRUSt, используемое для оценки бактериальных функций, и полученные результаты показали, что у пациентов с азооспермией наблюдалась повышенная экспрессия генов, связанных с метаболизмом нуклеотидов, метаболизмом кофакторов и витаминов, биосинтезом и метаболизмом гликанов, семействами ферментов и энергетическим обменом, а также сниженной экспрессией генов, связанных с биodeградацией и метаболизмом ксенобиотиков, метаболизм терпеноидов и поликетидов, липидный обмен и метаболизм аминокислот.

Эти изменения в экспрессии увеличивают риск метаболических, инфекционных и иммунных заболеваний у пациентов с азооспермией по сравнению с группой здорового контроля.

⁹⁰ Bae H. S., Im W. T., Lee S. T.: *Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1155–1161, 2005.

Часть II. Результаты собственных исследований тестикулярного микробиома

Глава 10. Первый российский опыт исследования микробиома тестикул методом высокопроизводительного секвенирования NGS

10.1. Введение и актуальность

Для выявления роли таксономического бактериального разнообразия тестикулярного микробиома и микробиома уретры в развитии мужской infertility с целью демонстрации первых результатов исследования бактериальной ДНК урогенитального тракта у infertile мужчин с применением метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) нами был разработан дизайн проведения первого в России пилотного исследования структуры тестикулярного микробиома.

Для идентификации групп бактериальных таксонов, позволяющих предположить наличие infertility, нами была поставлена следующая задача: определение таксономической структуры микробиоты пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. Данная патология была выбрана не случайно, так как для данной группы пациентов было показано проведение не только варикоцелэктомии, но и открытой биопсии яичка с целью верификации диагноза «азооспермия».

Варикоцеле, будучи по своей сути сосудистой патологией, характеризуется патологическим расширением, удлинением и извитостью вен гроздьевидного сплетения, расположенных в пределах семенного канатика. Данное гемодинамическое нарушение является причиной ряда клинических проявлений, включая болевой синдром, чувство дискомфорта, а также прогрессирующее снижение тестикулярной функции. Ключевым следствием заболевания является индукция мужского бесплодия, что объективно подтверждается наличием патологических отклонений в анализах эякулята — как в количественных, так и в качественных показателях сперматозоидов⁹¹.

Причинно-следственная связь в отношении мужской infertility и варикоцеле до сих пор является предметом обсуждения в урологическом

⁹¹ Cho, C. L., & Esteves, S. C. (2021). Clinical and surgical management of varicocele in the era of assisted reproductive technology. *Translational Andrology and Urology*, 10(6), 2666–2684

сообществе⁹². Одной из причин патоспермии может являться нарушение функциональности гематотестикулярного барьера. ГТБ предотвращает инвазию патологически активных веществ и проникновение антигенов сперматозоидов в эпителий семенных канальцев, тем самым ингибируя аутоиммунные реакции. Также способствует пролиферации иммунносупрессивных агентов при воздействии негативных регуляторных факторов, включая тестикулярные макрофаги, лимфоциты, дендритные клетки и тучные клетки⁹³.

Появление секвенирования нового поколения (NGS) позволило более точно охарактеризовать микробиом человека и определить наличие собственного биотопа различных топографических локаций.

Анализ экспрессии генов, в частности, не только самих клеток человека, но и колонизирующих его бактериальной ДНК микроорганизмов, занимает особое место в прогнозе стратегий лечения инфертильных пациентов. Зная о многообразной и ответственной роли микробиоты урогенитального тракта, которая изучена далеко не в полном объеме, мы продолжаем предлагать ее как предмет дискуссий и исследований. В том числе для подтверждения и/или опровержения гипотезы о ее антагонизме к патогенной микрофлоре⁹⁴.

Corpus humanum — сложнейшая структура мироздания, где все функциональные системы взаимосвязаны между собой. Наши бактерии не являются исключением, и активно влияя на анатомические и физиологические характеристики местных тканей, которые они колонизируют, не обходят вниманием регуляцию важных витальных функций, в том числе и репродуктивную. Данная ситуация, в свою очередь, может сыграть ключевую роль в вопросах сохранения и восстановления репродуктивного потенциала, что сегодня вызывает тревогу и заботу о будущем поколении в мировом сообществе⁹⁵.

Актуальные клинические рекомендации Российских и европейских научных сообществ в клинических рекомендациях определяют диагностический

⁹² Gupta C., Chinchole A., Shah R., Pathak H., Talreja D., Kayal A. Microscopic varicocelectomy as a treatment option for patients with severe oligospermia. *Investig Clin Urol.* 2018 May; 59(3):182–186. doi: 10.4111/icu.2018.59.3.182. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29744475; PMCID: PMC5934280.

⁹³ Fang Y., Su Y., Xu J., Hu Z., Zhao K., Liu C., Zhang H. Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2021 Aug 31; 12:729539. doi: 10.3389/fimmu.2021.729539. PMID: 34531872; PMCID: PMC8438154.

⁹⁴ Santacroce L., Imbimbo C., Ballini A., Crocetto F., Scacco S., Cantore S., Di Zazzo E., Colella M., Jirillo E. Testicular Immunity and Its Connection with the Microbiota. Physiological and Clinical Implications in the Light of Personalized Medicine. *J Pers Med.* 2022 Aug 20; 12(8):1335. doi: 10.3390/jpm12081335.

⁹⁵ Ventimiglia E. et al. Extensive Assessment of Underlying Etiological Factors in Primary Infertile Men Reduces the Proportion of Men with Idiopathic Infertility. *Front Endocrinol.* 2021; 12. doi: 10.3389/fendo.2021.801125.

стандарт в плане подготовки к использованию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для мужчин исключительно культуральными методами анализа эякулята^{96, 97}. Занимаемая учеными позиция, представляется нам весьма ограниченной и обусловлена не чем иным, как отсутствием серьезной доказательной базы о наличии и верификации микроорганизмов, не попавших в культуральный диагностический срез и, соответственно, в клинических рекомендациях.

Сложившаяся ситуация дополнительно осложнена тем, что традиционные методы микробиологических исследований (культуральный посев, ПЦР, микроскопия) позволяют идентифицировать лишь менее 2% известных бактериальных штаммов урогенитального тракта. Это связано с тем, что большинство микроорганизмов являются некультивируемыми *in vitro*, требуют специфических условий для роста, представлены в низких концентрациях, но играют ключевую роль в микробном балансе.

В работе Sender et al. (2016) было показано, что классическое представление о соотношении бактерий и человеческих клеток 10:1 является завышенным. Авторы пересчитали это соотношение, учитывая: 1) объем различных ниш (кишечник, кожа, урогенитальный тракт); 2) плотность бактериальной колонизации (наибольшая — в толстой кишке, значительно меньшая — в мочеполовой системе). Общее количество клеток организма (оценка ≈ 30 трлн человеческих клеток vs ≈ 39 трлн бактерий, т. е. $\approx 1,3:1$)^{98, 99}. Эта ограниченная способность установления таксономической структуры урогенитального тракта усугубляется отсутствием достаточного объема информации по рассматриваемой проблематике в мировом научном сообществе, а также отсутствием единого мнения о связи микробиоты с репродуктивным здоровьем мужчин. Вот почему исследование данного аспекта является крайне актуальным и необходимым для дальнейшего развития и совершенствования диагностических подходов^{100, 101}.

⁹⁶ European Association of Urology. EAU guidelines on male infertility. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf>. Accessed May 2, 2019

⁹⁷ Урология. Российские клинические рекомендации / Под ред. Ю. Г. Аляева, П. В. Глыбочко, Д. Ю. Пушкар. — М.: Медфорум, 2018. — 544 с.

⁹⁸ WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition. Geneva: World Health Organization; 2021.

⁹⁹ Sender R., Fuchs S., Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016; 164 (3): 337-40. PMID: 26824647. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

¹⁰⁰ Boitrelle F. et al. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel)*. 2021; 11(12):1368. doi: 10.3390/life11121368.

¹⁰¹ Doroftei B., Ilie O. D., Dabuleanu A. M., Hutanu D., Vaduva C. C. A Retrospective Narrative Mini-Review Regarding the Seminal Microbiota in Infertile Male. *Medicina* 2022 Aug 7; 58(8):1067. doi: 10.3390/medicina58081067. PMID: 36013533; PMCID: PMC9414835.

10.2. Материалы и методы

В период с 2020 по 2022 год мы провели первое в России пилотное исследование, в ходе которого был использован биоматериал тестикулярной ткани, полученной путем открытой биопсии яичка, и материал мазков из уретры у инфертильных пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. Полученный материал (11 мазков из уретры и 10 образцов тестикулярной ткани) был направлен для проведения высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

Пациенты должны были соответствовать критериям:

- добровольное информированное согласие на участие в исследовании;
- возраст старше 18 лет;
- бесплодие в браке более 1 года при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции;
- отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, в т. ч. гипоплазии, онкологической патологии;
- отсутствие антибактериальной терапии в течение 3 месяцев;
- наличие варикоцеле, подтвержденного ультразвуковым исследованием органов мошонки с доплерометрией.

Противопоказания для включения в исследуемую группу:

- наличие онкологической патологии, ИППП, генетические и эндокринные факторы бесплодия;
- тяжелая соматическая патология на момент обследования;
- регулярный прием лекарственных средств, приводящих к развитию бесплодия и гипогонадизма;
- повышение концентрации PSA в сыворотке крови более 4 нг/мл и/или его свободной фракции более 5 нг/мл;
- психические заболевания, хронический алкоголизм и наркомания, наличие ВИЧ-инфекции.

10.3. Результаты

В ходе исследования результаты секвенирования микробиоты яичка и уретры показали бактериальные пейзажи, в которых доминировали определенные микробные сообщества (рис. 10.1, 10.2).

В нашем исследовании мы сравнили образцы мазков из уретры с образцами тканей яичка у пациентов. Результаты показали, что индекс альфа-разнообразия Шеннона, который используется для оценки разнообразия микробиоты, был значительно выше в образцах из яичка. Это означает, что в тканях

яичка присутствует более богатое и разнообразное сообщество микроорганизмов по сравнению с теми, что были найдены в уретре.

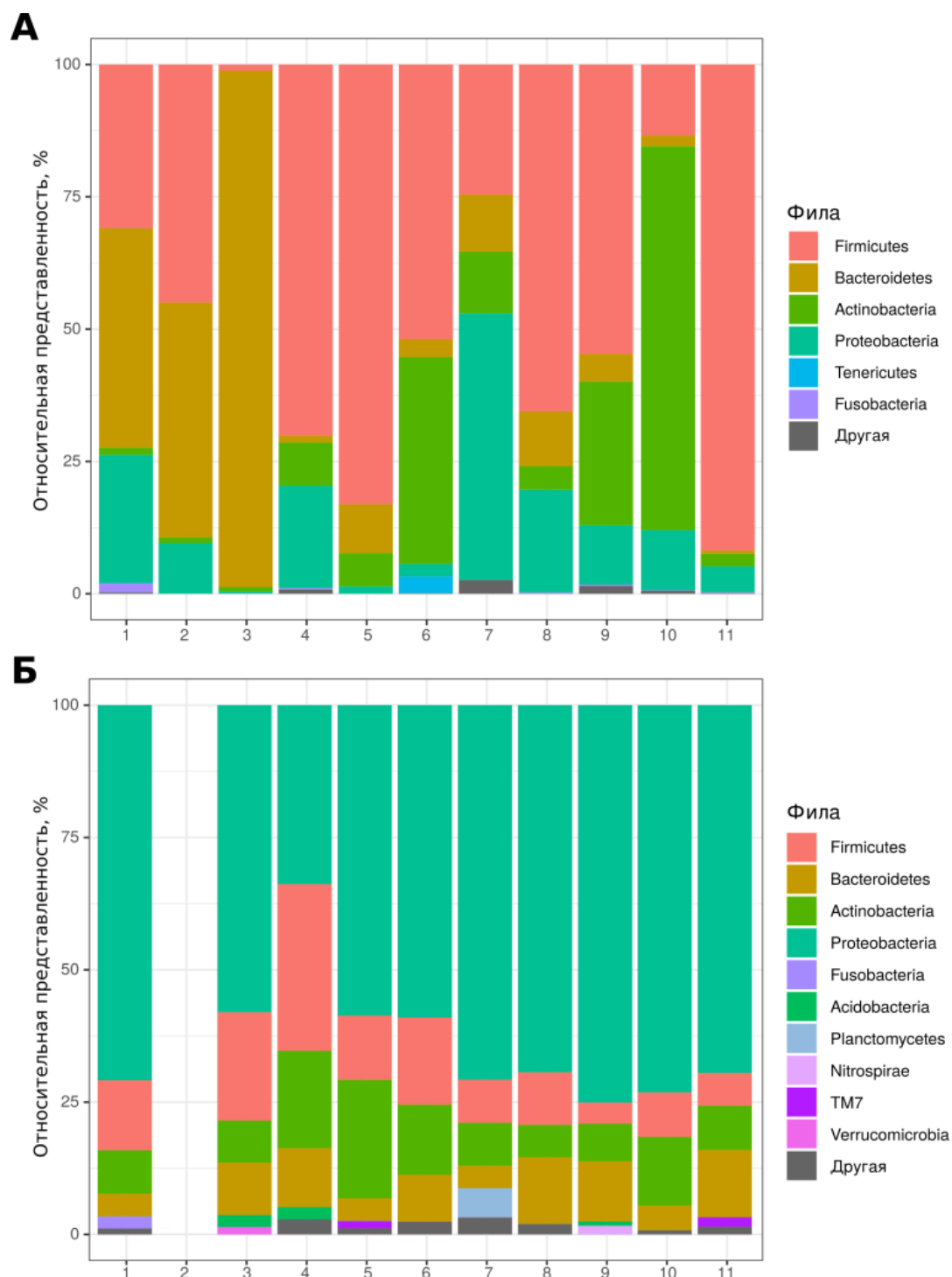


Рисунок 10.1. Таксономический состав микробиома уретры (А) и ткани яичка (Б) на уровне фил у пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. Отображены только филы, представленность которых $> 1\%$ хотя бы в одном из образцов

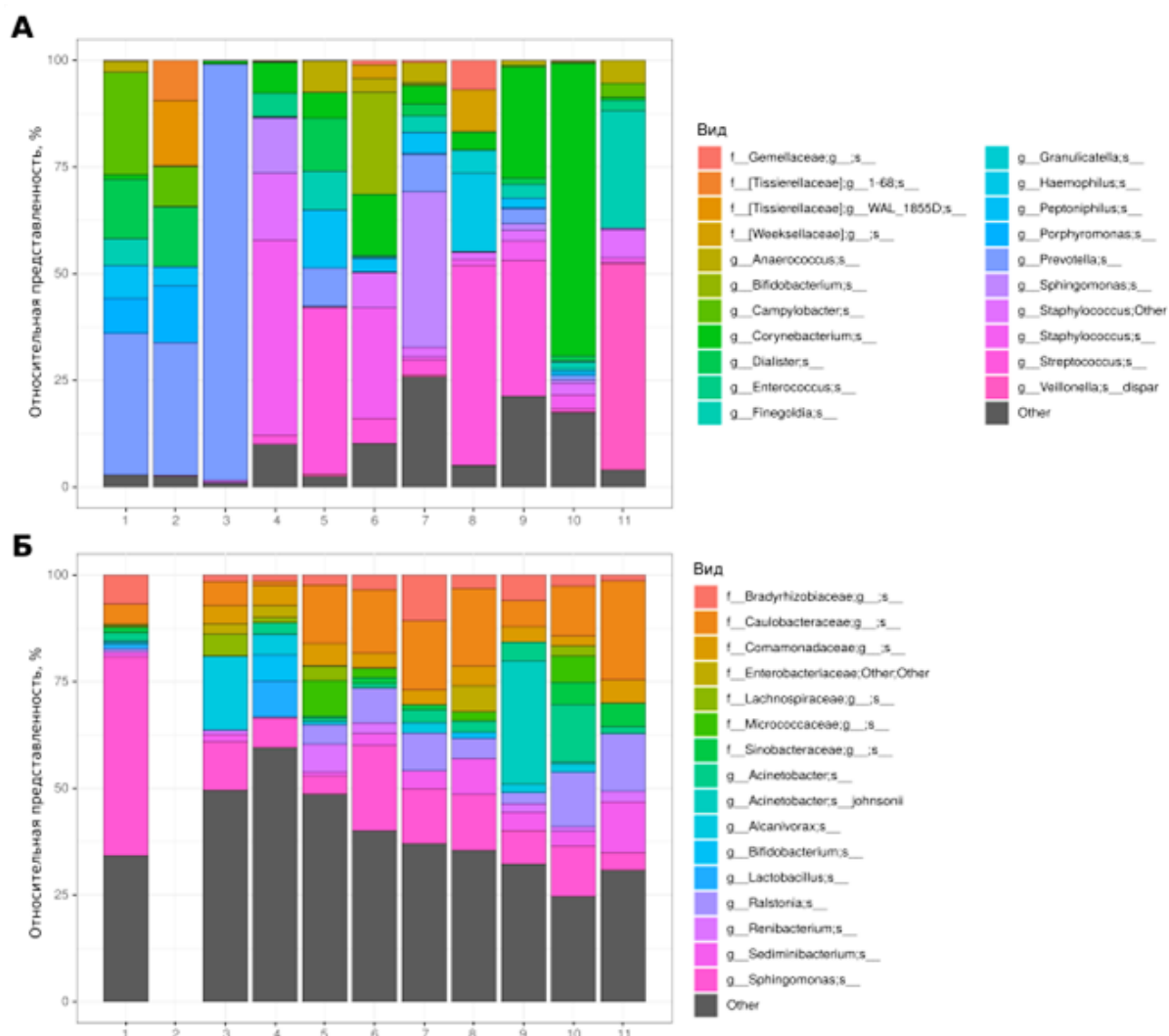


Рисунок 10.2. Таксономический состав микробиома уретры (А) и ткани яичка (Б) на уровне видов у пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. Отображены только виды, представленность которых > 5% хотя бы в одном из образцов

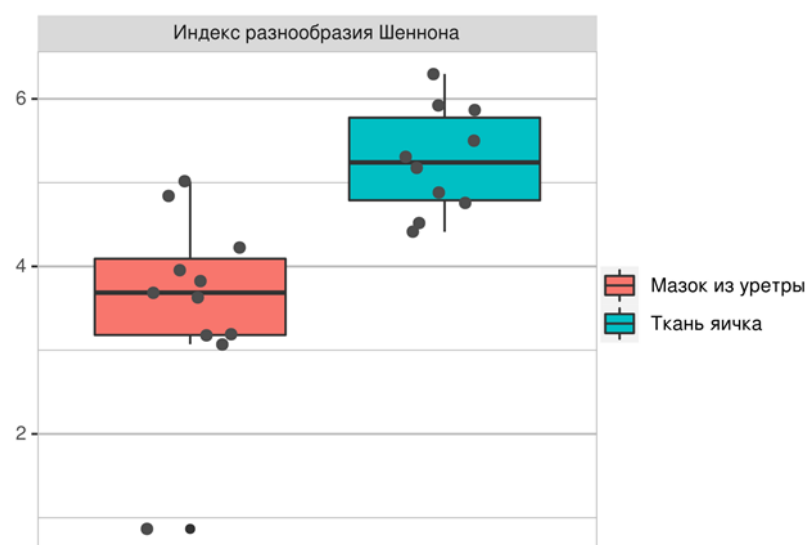


Рисунок 10.3. Индекс альфа-разнообразия Шеннона

Такое различие в разнообразии может свидетельствовать о том, что ткани яичка обладают более сложной экосистемой микробов. Это может быть связано с уникальными условиями, в которых развиваются микроорганизмы в яичках, такими как температура, уровень кислорода и наличие специфических питательных веществ. Более высокое разнообразие микробиоты может иметь важное значение для здоровья яичек и репродуктивной функции в целом (см. рис. 10.3).

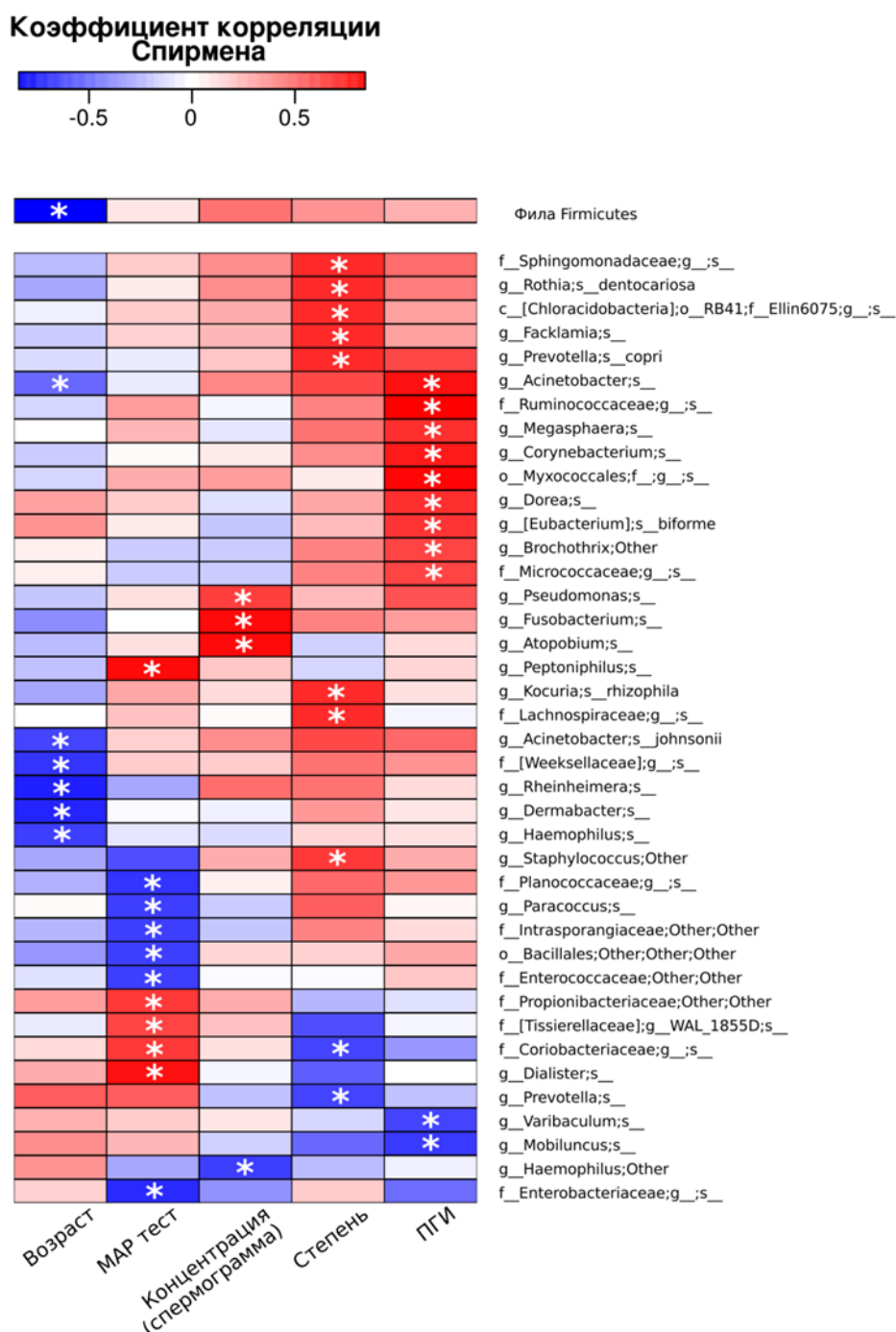


Рисунок 10.4. Тепловая карта коэффициентов корреляции Спирмена на основе анализа микробиоты. Все корреляции, отмеченные на рисунке звездочкой, достоверные. Синие клетки — отрицательная корреляция, красные — положительная

Нами был проведен детальный корреляционный анализ, направленный на изучение взаимосвязей между представленностью различных таксонов микробиоты и индексом Шеннона с различными клиническими показателями, включая возраст пациентов, степень тяжести состояния и результаты патолого-гистологического исследования (ПГИ).

Результаты анализа выявили значимые корреляции, которые могут иметь важные клинические последствия для понимания влияния микробиоты на репродуктивное здоровье. В частности, было установлено, что возраст пациентов достоверно отрицательно коррелирует с представленностью фила *Firmicutes* в микробиоте уретры. Это означает, что с увеличением возраста наблюдается снижение относительного *Firmicutes*, что может свидетельствовать о возрастных изменениях в составе микробиоты и их потенциальном влиянии на репродуктивные функции. Фила *Firmicutes* известна своей ролью в метаболизме и поддержании целостности слизистых оболочек, а ее уменьшение может привести к дисбалансу микробиоты и ассоциированным с этими нарушениями.

С другой стороны, мы также обнаружили положительную корреляцию между концентрацией спермы и представленностью неопределенного вида рода *Pseudomonas*. Чем выше концентрация сперматозоидов в спермограмме, тем выше уровень *Pseudomonas* в микробиоте. Это открытие может указывать на возможную роль *Pseudomonas* в поддержании или даже улучшении параметров сперматогенеза. Роды *Pseudomonas* известны своей способностью к адаптации к различным условиям, а также к синтезу биологически активных соединений, которые могут оказывать влияние на репродуктивное здоровье (см. рис. 10.4).

Аналогично построен рис. 10.5, где представлена тепловая карта коэффициентов корреляции Спирмена на основе анализа микробиоты яичка.

В рамках нашего предстоящего пилотного исследования было проведено сравнение микробиоты у курильщиков и некурящих пациентов с целью выявления возможных различий в составе микробиоты, ассоциированных с курением, и их потенциального влияния на репродуктивное здоровье.

Анализ микробиоты был осуществлен на основе образцов мазков из уретры и биопсированной ткани яичка. Результаты показали статистически значимые отличия в композиции микробиоты между двумя группами. В частности, в мазках из уретры (см. рис. 10.6А) были выявлены различия в относительном количестве низкопредставленных таксонов, что может указывать на влияние курения на экосистему микробиоты мочеполовой системы. Аналогичные различия были зафиксированы и в образцах ткани яичка (см. рис. 10.6Б), что подчеркивает возможное влияние курения на микробиом репродуктивных органов.

Коэффициент корреляции
Спирмена

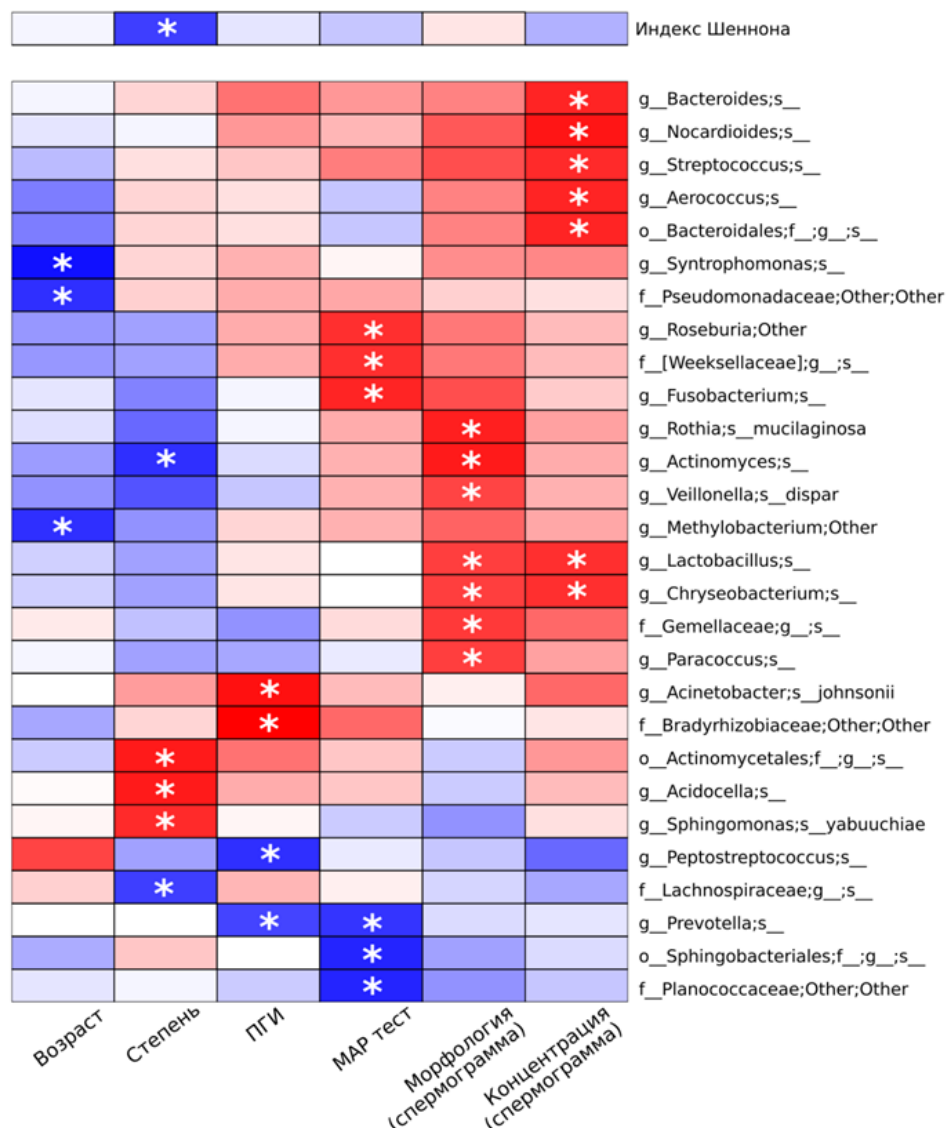
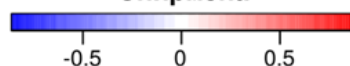


Рисунок 10.5. Тепловая карта коэффициентов корреляции Спирмена на основе анализа микробиоты яичка, * — p value < 0,05 у пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле

Эти изменения в составе микробиоты могут иметь важные клинические последствия, поскольку они могут способствовать нарушению нормального функционирования репродуктивной системы и, возможно, быть связаны с развитием различных патологий, включая бесплодие. Наше исследование направлено на дальнейшее изучение этих различий, чтобы установить их роль в патогенезе репродуктивных расстройств и оценить потенциальные терапевтические стратегии, направленные на восстановление нормального микробиома у мужчин, страдающих бесплодием.

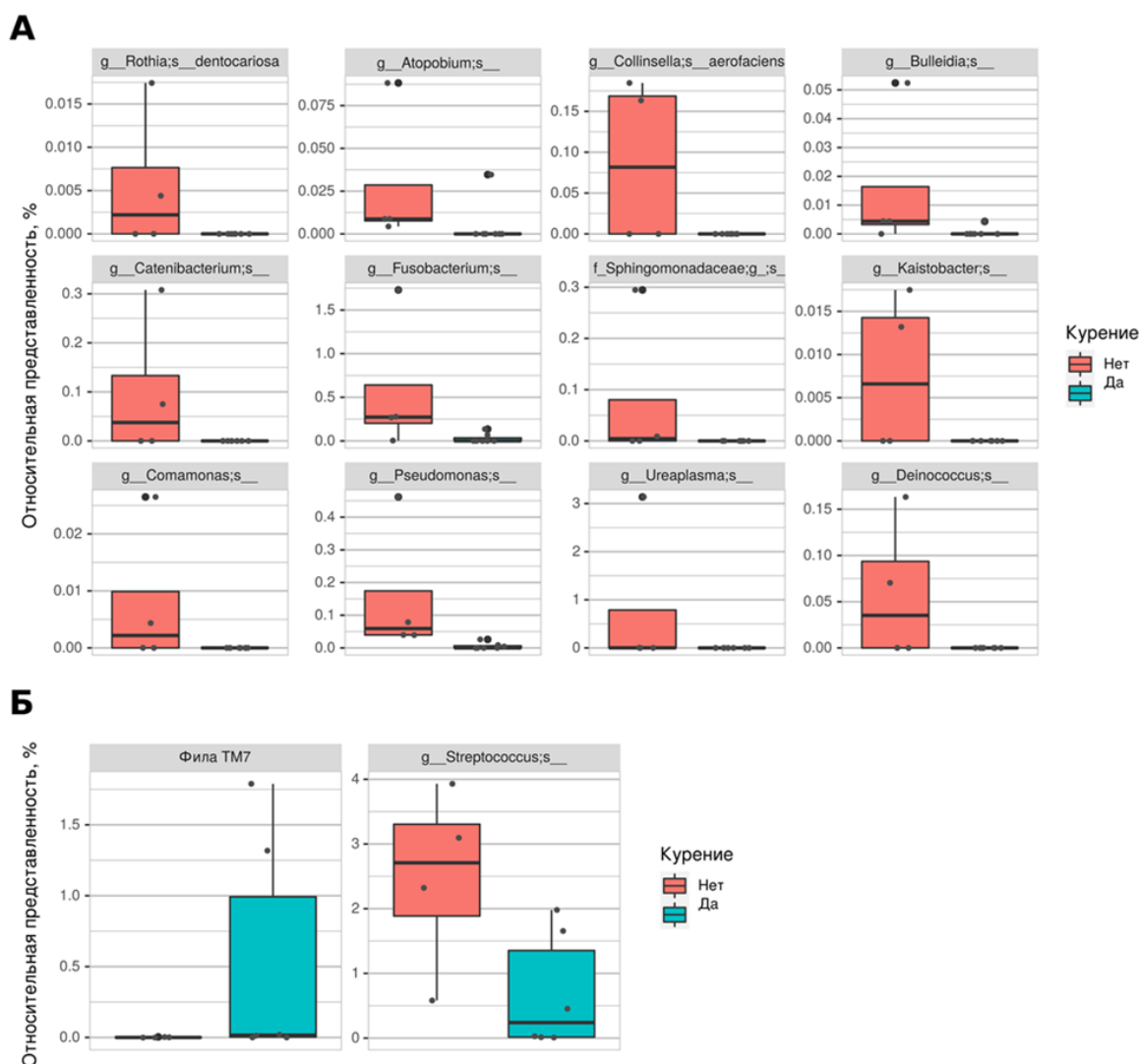


Рисунок 10.6. Достоверно отличающиеся в зависимости от статуса курения таксоны микробиоты уретры (А) и ткани яичка (Б)

Последовательности гена 16S рРНК («риды») полученные в процессе секвенирования были проанализированы и систематизированы с помощью ПО QIIME (версия 1.9.1)¹⁰².

10.4. Обсуждение и выводы

В проведенном нами исследовании (одном из первых в России), целью которого было определение корреляционных связей бактериального разнообразия тестикулярного микробиома и микробиома урогенитального тракта в развитии мужского бесплодия, мы показали, что у инфертильных пациентов тестикулярные ткани содержат комменсальные бактерии, ассоциированные с тканями.

¹⁰² Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature methods. 2010. Т. 7. № 5. Р. 335–336.

Параллельно мы продемонстрировали первые собственные результаты исследования бактериальной ДНК урогенитального тракта у инфертильных мужчин с применением метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS). Статистический анализ прямо указал, что тестикулярная ткань мужчин с сочетанием необструктивной азооспермии и варикоцеле имеет качественно и количественно разнообразный таксономический спектр на уровне как филов, так и ридов, что доказывает значимость микробиоты яичка в регуляции сперматогенеза. Это может стать поводом для рассуждений о влиянии микробиома на репродуктивное здоровье¹⁰³. Современные исследования опровергают представление о стерильности тестикулярной ткани, демонстрируя наличие специфического микробного сообщества в мужской репродуктивной системе.

Как показали Nou et al. (2020), ткань яичек обладает уникальным микробным профилем, существенно отличающимся от других биотопов организма, что указывает на ее специализированную микробную нишу¹⁰⁴. Эти данные подтверждаются работой Altmäe et al. (2019), выявивших характерный микробный состав не только в эякуляте, но и в тестикулах, что подчеркивает сложную организацию репродуктивного микробиома¹⁰⁵. Особое значение имеет выявленная Baud et al. (2019) связь между дисбиозом мужской репродуктивной системы и нарушениями сперматогенеза: изменения в составе микробиоты ассоциированы с олигозооспермией и азооспермией, что свидетельствует о потенциальном участии микробных факторов в патогенезе мужского бесплодия¹⁰⁶. Полученные нами данные согласуются с этими выводами, подтверждая гипотезу о влиянии бактериального сообщества яичка на репродуктивную функцию и необходимость дальнейшего изучения его роли в развитии инфертильности.

Таким образом, ориентирование последующих научных исследований качественного и количественного состава тестикулярного микробного сообщества может стать краеугольным камнем инновационного подхода в диагно-

¹⁰³ Magill R. G., MacDonald S. M. Male infertility and the human microbiome. *Front Reprod Health*. 2023 Jun 9; 5:1166201. doi: 10.3389/frph.2023.1166201.

¹⁰⁴ 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. *Hum Reprod Update*. 2019 May 1; 25(3):298-325. doi: 10.1093/humupd/dmy048. PMID: 30938752.

¹⁰⁵ Altmäe S., Franasiak J. M., Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology* volume 16, pages 703–721 (2019). doi: 10.1038/s41585-019-0250-y. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732723.

¹⁰⁶ Baud D., Pattaroni C., Vulliemoz N., Castella V., Marsland B. J., Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol*. 2019. 12 февраля. 10:234. doi: 10.3389/fmicb.2019.00234. PMID: 30809218; PMCID: PMC6379293.

стике и лечении мужского бесплодия, вызванного различными видами азооспермии. В настоящее время разработка и внедрение в практику принципиально новой, основанной на использовании молекулярных инструментов стратегии и тактики скрининга мужской инфертильности, является актуальной как никогда. Это включает в себя применение современных методов, таких как высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS), что подчеркивает необходимость развития и внедрения этих технологий в научно-исследовательские центры России.

Глава 11. Структура микробиоты фертильных и инфертильных пациентов с различными видами азооспермии

11.1. Введение и актуальность

Исследование микробиома человека вызывает все больший научный интерес и привлекает пристальное внимание врачей, генетиков, молекулярных биологов и микробиологов.

Организм человека — сложнейшая сбалансированная экосистема, активно взаимодействующая с внешним миром и, как следствие, с огромным количеством микробов¹⁰⁷. Внутренняя связь и внешняя, может быть положительной, нейтральной или патогенной, и микроорганизмы играют ключевую роль в биоценозе человека и сохранения его здоровья.

Микробный состав чутко реагирует и активно варьируется в зависимости от функций и расположения органов и систем, взаимодействия с внешней средой¹⁰⁸. Он также зависит от пространства, в котором постоянно находится человек, и его контактов с окружающей средой, экологией, питанием, воздействием вредных факторов и приемом лекарственных препаратов. Вместе с тем разные различные микробные профили локаций органов и систем организма связаны с конкретными заболеваниями, выявленными в ходе сравнения различия микробного фона между больными и здоровыми людьми.

Интересно, что различия могут возникать практически на всех уровнях таксономического ранга¹⁰⁹ и проявляться в увеличении количества конкретных микроорганизмов или снижении микробиомного разнообразия¹¹⁰.

Уже не подлежит сомнению, что сильнейшим фактором, вызывающим снижение таксономического разнообразия и богатства микробиома, а также появление мажорных либо минорных таксонов, является прием антибактери-

¹⁰⁷ Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Vergès M. C., Charles T. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020 Jun 30; 8(1):103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.

¹⁰⁸ Simon J. C., Marchesi J. R., Mougél C., Selosse M. A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*. 2019 Jan 11; 7(1):5. doi: 10.1186/s40168-019-0619-4.

¹⁰⁹ Gilbert J. A., Quinn R. A., Debelius J., Xu Z. Z., Morton J., Garg N. et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 2016 Jul 7; 535(7610):94–103. doi: 10.1038/nature18850.

¹¹⁰ Manor O., Dai C. L., Kornilov S. A., Smith B., Price N. D., Lovejoy J. C. et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun*. 2020 Oct 15; 11(1):5206. doi: 10.1038/s41467-020-18871-1.

альных лекарственных препаратов и химиотерапия, которые впоследствии меняют всю микробиологическую палитру и изменяют его таксономическую структуру.

Это связано с повышенной восприимчивостью к другим патогенам, нарушением регуляции иммунитета и появлением резистентности с последующим развитием полирезистентных штаммов, и формированию целого клана нозокомиальных инфекционных агентов^{111, 112}.

На протяжении веков сложилось устойчивое мнение, что мужская репродуктивная система практически стерильна, но в свете последних научных открытий она представляется сложной мозаикой микробных сообществ¹¹³. Новые данные убедительно доказывают, что в вопросах мужской фертильности таксономический состав микробиоты репродуктивного тракта находится в первом ряду сложного оркестра человеческого организма и играет не последнюю роль¹¹⁴. Разнообразно и гармонично функционирующая половая микробиота необходима для оптимального репродуктивного мужского здоровья.

К сожалению, сегодня еще не разработаны тесты, определяющие порог и прогнозирующие влияние конкретных микроорганизмов на качество семенной жидкости, позволяющей объективно признать ее непригодной для оплодотворения. Вместе с тем последние достижения в области молекулярно-генетической идентификации микробиома, в частности, применение секвенирования нового поколения (NGS), позволяет понять сложную цепь взаимосвязи микробиома и его хозяина¹¹⁵.

Сбалансированная и многообразная микробиота мужской половой системы является критически важным фактором, способствующим поддержанию оптимального уровня репродуктивного здоровья. На сегодняшний день не существуют стандартных диагностических тестов, способных определить критическую границу и прогнозировать влияние конкретных микроорганизмов на качество семенной жидкости, что могло бы являться основанием для ее признания непригодной для оплодотворения. Достижения в области молеку-

¹¹¹ Francino M. P. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol.* 2016 Jan 12; 6:1543. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543.

¹¹² Raymond F., Ouameur A. A., Déraspe M., Iqbal N., Gingras H., Dridi B. et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J.* 2016 Mar; 10(3):707-20. doi: 10.1038/ismej.2015.148.

¹¹³ Zuber A., Peric A., Pluchino N., Baud D., Stojanov M. Human Male Genital Tract Microbiota. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 8; 24(8):6939. doi: 10.3390/ijms24086939.

¹¹⁴ Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariatì F., D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput.* 2020 Apr 13; 9(2):10. doi: 10.3390/ht9020010.

¹¹⁵ Magill R. G., MacDonald S. M. Male infertility and the human microbiome. *Front Reprod Health.* 2023 Jun 9; 5:1166201. doi: 10.3389/frph.2023.1166201.

лярно-генетической идентификации микробиома, особенно в таких современных методах, как секвенирование следующего поколения (NGS), тем не менее открывают новые горизонты для понимания сложных взаимодействий между микробиомом и его хозяином. Последовательность гена 16S рРНК зарекомендовала себя в качестве эффективного молекулярного маркера для независимой от культуры идентификации и классификации различных бактериальных сообществ, что дает возможность углубленного изучения микробиоты, ее структурных особенностей и функциональных возможностей¹¹⁶.

Благодаря этой методике возможно оценить и биогеографическое распределение таксонов, что помогает понять, как экологические условия Южной части России, состав почвы и доступные источники питания, влияют на состав микробиоты в различных экосистемах. Таким образом, использование последовательностей 16S рРНК не только углубляет наши знания о микробиоме и его роли в экосистемах, но и создает основы для дальнейших исследований, направленных на изучение взаимоотношений микроорганизмов с их окружением. Эти данные могут быть полезны в различных областях, включая экологию, охрану окружающей среды, агрономию и медицинские науки, поскольку понимание микробного разнообразия и его функций открывает новые пути для разработки эффективных стратегий управления экосистемами и повышения качества жизни¹¹⁷.

11.2. Материалы и методы

В проведенном нами исследовании рассматривается таксономическая структура микробиоты у пациентов с различными формами азооспермии, а именно обструктивной и необструктивной, в сравнении с пациентами из группы фертильности, которые имели детей в анамнезе.

Цель исследования заключалась в проведении сравнительного анализа этих микробиомов с целью выявления возможных корреляций между структурами микробиоты и характеристиками фертильности у пациентов, проживающих преимущественно на юге России, в частности в Краснодарском крае, в течение последних 3 лет получавших антибактериальную терапию по различным причинам.

¹¹⁶ Paul B. Concatenated 16S rRNA sequence analysis improves bacterial taxonomy [version 3; peer review: 2 approved]. F1000Research 2023, 11:1530 doi: 10.12688/f1000research.128320.3.

¹¹⁷ Vetrovsky T., Baldrian P. (2013) The Variability of the 16s rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. PLOS One, 8. doi: 10.1371/journal.pone.0057923.

Материалом для исследования стали образцы тестикулярной ткани и урогенитального тракта фертильных и инфертильных пациентов с различными видами азооспермии ($n = 57$).

От каждого участника исследования, включенного в группу, по собственному желанию, в обязательном порядке требовалось добровольное информированное согласие на участие. Также были установлены строгие критерии включения в исследования:

- возраст старше 18 лет;
- бесплодие в браке более 1 года при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции;
- подтвержденная необструктивная азооспермия, отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, их гипоплазии, онкологической патологии, а также отсутствие ИППП.

Соответственно, критериями исключения стали:

- отсутствие совершеннолетия;
- наличие онкопатологии, ИППП, генетические и эндокринные факторы бесплодия, тяжелая соматическая патология на момент обследования;
- регулярный прием лекарственных средств, приводящих к развитию бесплодия и гипогонадизма;
- повышение концентрации PSA в сыворотке крови более 4 нг/мл и/или его свободной фракции более 5 нг/мл;
- психические заболевания, хронический алкоголизм, наркомания и наличие ВИЧ-инфекции.

Все процедуры были осуществлены в соответствии с установленным протоколом вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В рамках данного исследования для сохранения репродуктивного потенциала участников было проведено микрохирургическое вмешательство — открытая биопсия яичка (micro-TESE). Эта методика предполагает извлечение тканей яичка с целью получения сперматозоидов, что обеспечивает возможность дальнейшего использования данных клеток в рамках экстракорпорального оплодотворения. В частности, применялась техника внутрицитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), которая обеспечивает высокую эффективность в случаях мужского бесплодия.

Кроме того, в случаях, когда не было возможности произвести оплодотворение непосредственно в рамках протокола ВРТ, была предусмотрена криоконсервация биологического материала. Этот процесс позволяет замораживать полученные сперматозоиды или другие репродуктивные клетки, что создает возможность для их использования в будущем, избегая риска потери

репродуктивной функции. Использование данных современных методик обеспечивает надежное сохранение репродуктивного потенциала исследуемых лиц, что является важным аспектом в контексте мужской фертильности и репродуктивного здоровья в целом.

Участники были распределены на три группы по следующим критериям:

— группа 1 ($n = 29$) — пациенты с необструктивной азооспермией (НОА) и отсутствием детей;

— группа 2 ($n = 19$) — пациенты с обструктивной азооспермией (ОА);

— группа 3 ($n = 9$) — фертильные пациенты (ФЕРТ).

При проведении анализа ампликонов бактериального гена 16S рРНК для исследования бактериального разнообразия тестикулярной ткани использовался высокопроизводительный секвенатор нового поколения (NGS) (патент № 2810467 «Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин»).

Для выделения из образцов ДНК, предварительно обработанных лизоцимом, применялся колоночный метод (ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, Promega USA), а для исследования бактериального пейзажа урогенитального тракта и контроля чистоты метода у каждого обследуемого, кому проводилась биопсия яичка, был взят и биологический материал из уретры. Обработка данных проводилась с помощью программы QIIME (версия 1.9.1).

Одним из приоритетных направлений исследования явился сравнительный анализ таксономического состава микробиоты уретры и тестикулярной ткани в исследуемых группах.

11.3. Результаты

Таксономический состав микробиоты уретры

На первом этапе исследования было осуществлено систематическое сравнение таксономической структуры и уровня микробиологического разнообразия в анализируемых группах. Для этого была изучена альфа-разнообразие микробиоты, что представляет собой показатель, отражающий вариабельность видов внутри конкретной экосистемы. Основными метриками, используемыми для оценки альфа-разнообразия, стали индекс Шеннона и индекс Симпсона.

Индекс Шеннона является одним из ключевых индикаторов, который учитывает как обилие, так и редкость видов в образце. Он рассчитывается на основе пропорций каждого вида, что позволяет дать более полное представление о структуре сообщества. Чем выше значение индекса Шеннона, тем

больше видов представлено в исследуемом сообществе, и тем равномернее распределены их численности.

Индекс Симпсона, в свою очередь, фокусируется на вероятности того, что два случайно выбранных индивида из образца принадлежат одному и тому же виду, и также учитывает обилие различных видов. Этот индекс имеет важное значение для оценки устойчивости экосистемы: более низкие значения указывают на высокое видовое и генетическое разнообразие, которое, в свою очередь, может способствовать экологической устойчивости.

Кроме того, в рамках анализа было исследовано количество операционных таксономических единиц (OTU), что является стандартным показателем в микробиологических исследованиях, создающим основу для классификации и анализа микробных сообществ. Индекс Chao1 был также использован для оценки ожидаемого числа видов, учитывающего редкие виды в образцах.

Полученные результаты анализа показали, что альфа-разнообразие, индексы Шеннона и Симпсона, количество OTU и индекс Chao1 в исследуемых бактериальных сообществах не продемонстрировали статистически значимых различий между сравниваемыми группами.

Это указывает на сходство в таксономической структуре микробиоты у различных пациентов, что может иметь важные клинические и биологические импликации для понимания роли микробиома в здоровье и патологии мужской фертильности.

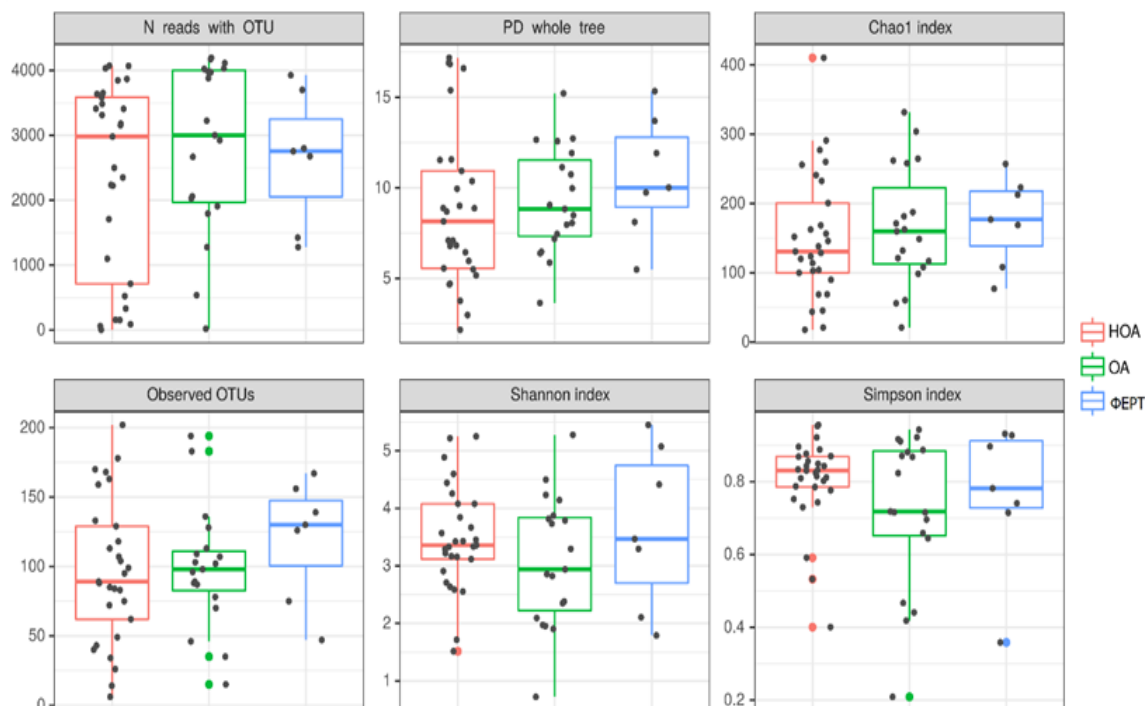


Рисунок 11.1. Альфа-разнообразие бактериального сообщества уретры.

Примечание: статистически достоверных отличий не обнаружено

Видовое разнообразие в группах, представленное на рис. 11.2, демонстрирует отличия только в низкопредставленных видах (не более 3% в среднем), т. е. микробиота уретры данных групп пациентов отличается незначительно.

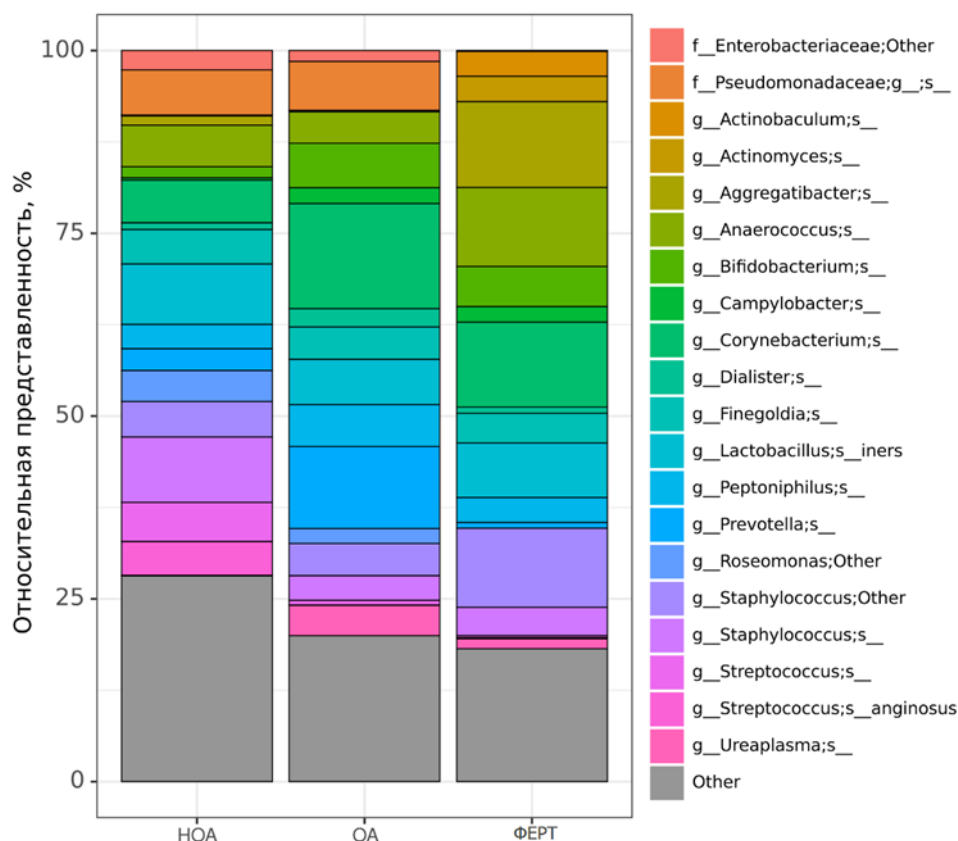


Рисунок 11.2. Наиболее представленные виды микробиоты уретры в группах сравнения

При анализе микробиоты уретры у этих же пациентов, аналогичных значительных различий в составе и представленности основных групп микроорганизмов не было обнаружено. Это может свидетельствовать о более стабильной экосистеме микробиоты уретры или о том, что микробные сообщества в этой области подвержены меньшему влиянию факторов, связанных с состоянием репродуктивной системы. Этот факт открывает новые горизонты для дальнейших исследований, направленных на понимание локализованных изменений микробиома, их взаимоотношений с воспалительными и репродуктивными процессами, а также возможности использования этих результатов для разработки новых диагностических и терапевтических подходов в области мужского здоровья (рис. 11.3).

Таксономический состав микробиоты тестикулярной ткани

Следующим этапом нашего исследования стала оценка альфа-разнообразия микробиоты, изолированной из тестикулярной ткани. Данная оценка,

представленной (на рис. 11.4), позволила более детально проанализировать структурные и функциональные отличия бактериальных сообществ между исследуемыми группами: пациентами с необструктивной азоосpermией (НОА), пациентами с обструктивной азоосpermией (ОА) и группой фертильных мужчин (ФЕРТ).

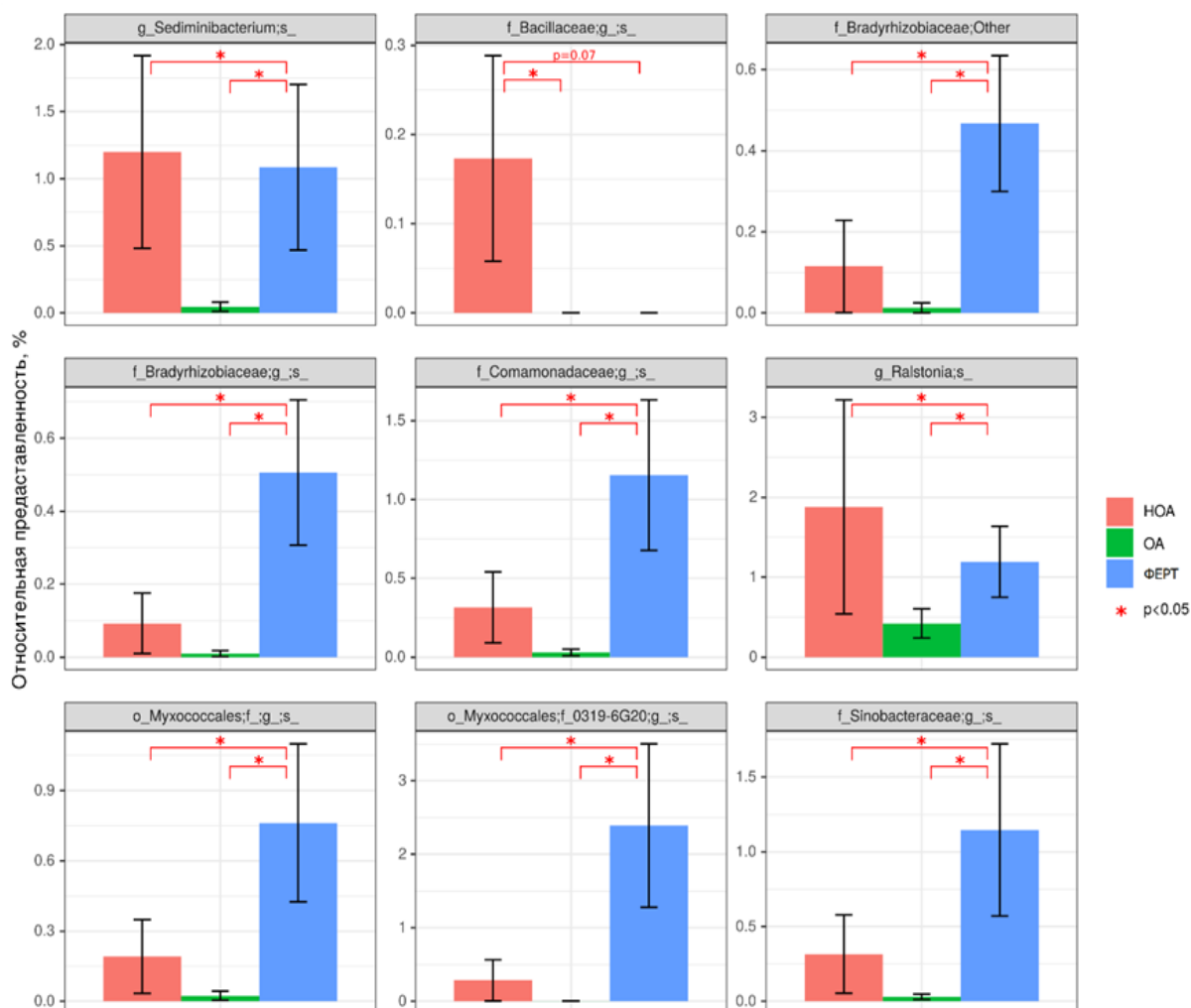


Рисунок 11.3. Статистически значимо отличающиеся между группами сравнения виды, обнаруженные в микробиоте уретры

В процессе анализа были использованы различные филогенетического разнообразия, включая индексы Шеннона, Симпсона, а также оценка Chao1, каждая из которых предоставляет уникальную информацию о составе и структуре микробной экосистемы. Основное внимание было уделено сравнению значений этих индексов между группами.

Результаты показали, что индексы филогенетического разнообразия, такие как индексы Шеннона и Симпсона, а также индекс Chao1, в группах НОА и ОА были статистически значимо ниже, чем в группе ФЕРТ. Это наглядно указывает на то, что разнообразие микробных видов в тканях яичка у пациентов с азоосpermией значительно беднее по сравнению с фертильными мужчинами.

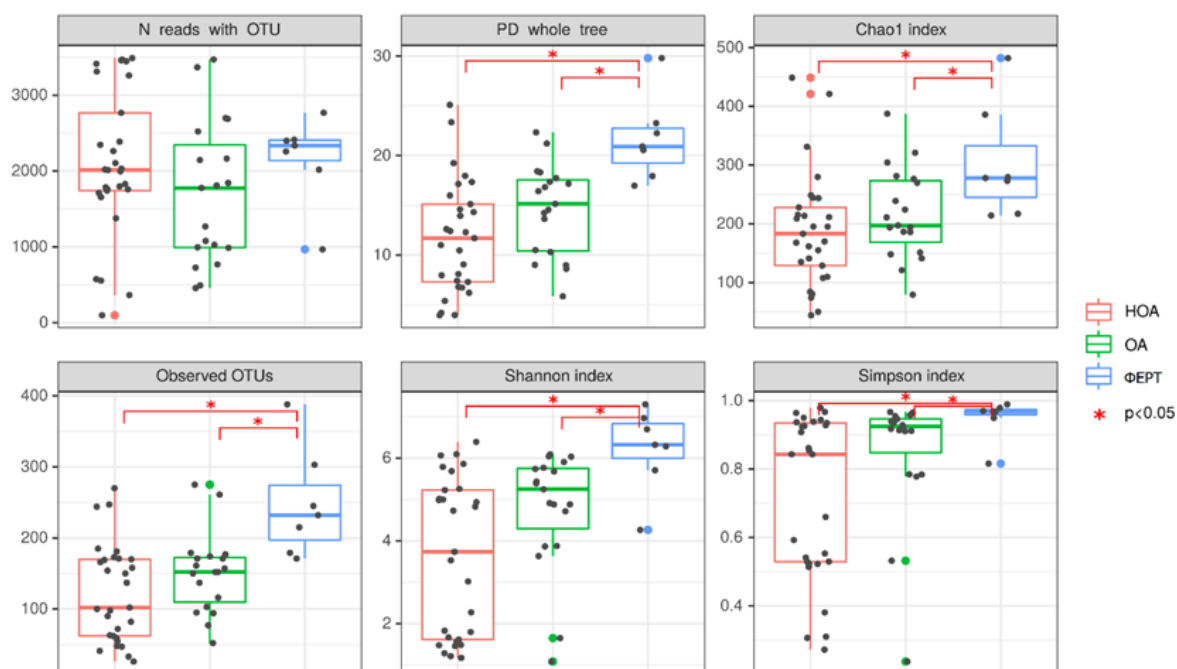


Рисунок 11.4. Альфа-разнообразие бактериального сообщества ткани яичка.

Примечания: * — достоверность различий между группами $p < 0,05$

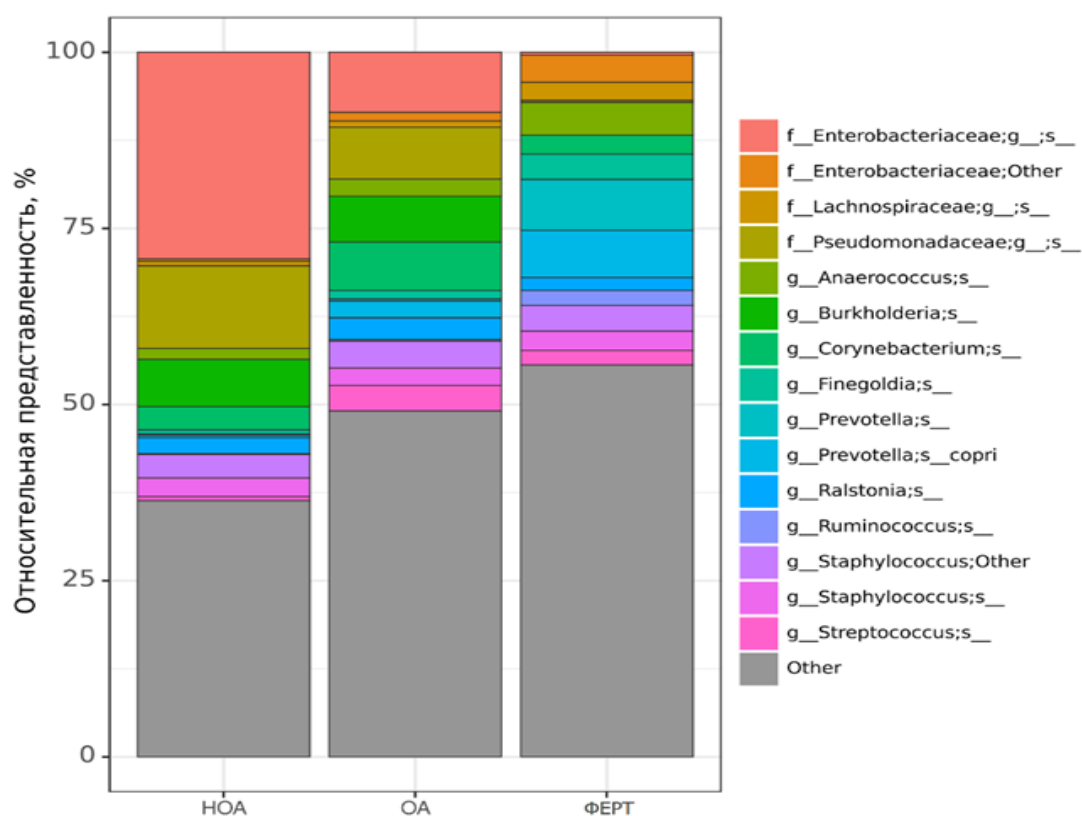


Рисунок 11.5. Наиболее представленные виды микробиоты яичка в группах сравнения

Снижение разнообразия бактериальных сообществ может иметь серьезные последствия для репродуктивной функции и указывает на возможные нарушения в симбиотических взаимодействиях между микроорганизмами и

клетками-носителями. Оба результата, как для НОА, так и для ОА, могут свидетельствовать о дисбиозе, который может выполнять определяющую роль в патогенезе бесплодия.

В свою очередь, анализ микробных сообществ ткани яичка выявил достоверные различия в представленности микробных фил, исследуемых группами сравнения (см. рис. 11.5).

В процессе анализа частоты встречаемости бактерий, которые были выявлены как общие для уретры и тестикулярной ткани, было установлено наличие лишь трех значимых различий между исследуемыми группами. Для этого анализа был использован точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение, осуществленное по методу Бенджамини — Хохберга, что позволило повысить надежность полученных данных.

Сравнивая данные двух групп пациентов с различными формами азооспермии, а именно группы необструктивной азооспермии (НОА) и группы обструктивной азооспермии (ОА), было установлено, что в группе НОА достоверно реже встречается неопределенный представитель рода *Prevotella*. Это наводит на размышления о возможной связи между снижением представленности этого рода бактерий у пациентов с необструктивной азооспермией.

В то же время, когда группы НОА и ОА сравниваются с фертильными мужчинами (группа ФЕРТ), наибольшее отличие проявляется в сниженной представленности таксонов бактерий, которые являются обычными компонентами нормального микробиома кишечника. Это наблюдение подчеркивает значимость кишечной микробиоты для репродуктивного здоровья мужчин и указывает на возможное влияние дисбиоза, а именно нарушенного состава микробиоты, на неблагоприятные репродуктивные исходы.

В группе фертильных мужчин (ФЕРТ) наблюдалась существенно повышенная относительная представленность филов *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Эти группы микроорганизмов обычно ассоциируются с микробиотой кишечника, где они играют важную роль в метаболизме, синтезе витаминов и поддержании гомеостаза. Примечательно, что многие из этих бактерий известны своей способностью эффективно ферментировать сложные углеводы и производить короткоцепочечные жирные кислоты, что может положительно влиять на здоровье организма в целом (рисунок 11.6).

Данные различия в представленности микробных таксонов могут свидетельствовать о потенциальных патофизиологических механизмах, связанных с мужским бесплодием. Уменьшение нормальных представителей кишечной микробиоты в тканях яичка у пациентов с азооспермией может указывать на системные нарушения, которые требуют дальнейшего изучения с целью пони-

мания их роли в репродуктивной функции. Эти результаты подчеркивают важность мультидисциплинарного подхода к исследованию микробиоты и ее влияния на здоровье мужчин и репродуктивные процессы.

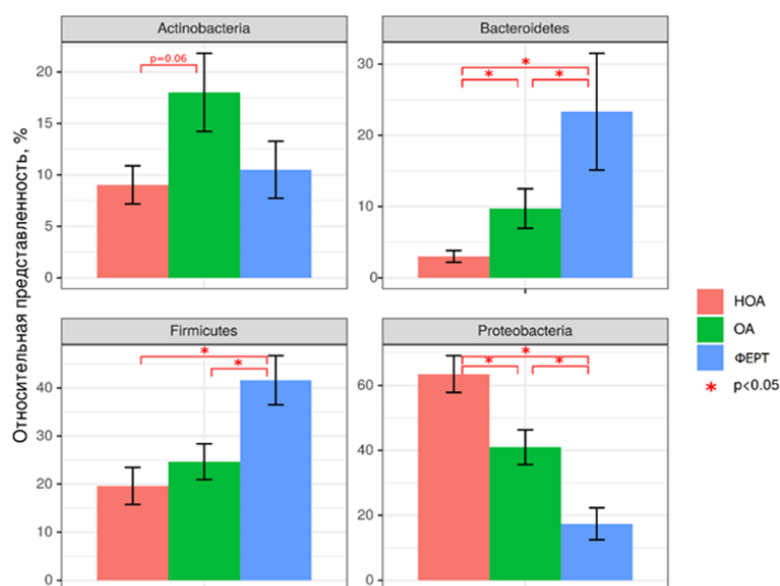


Рисунок 11.6. Статистически значимо отличающиеся между группами сравнения филы, обнаруженные в микробиоте ткани яичка.

Примечания: достоверность различий между группами $p < 0,05$ (тест Краскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга)

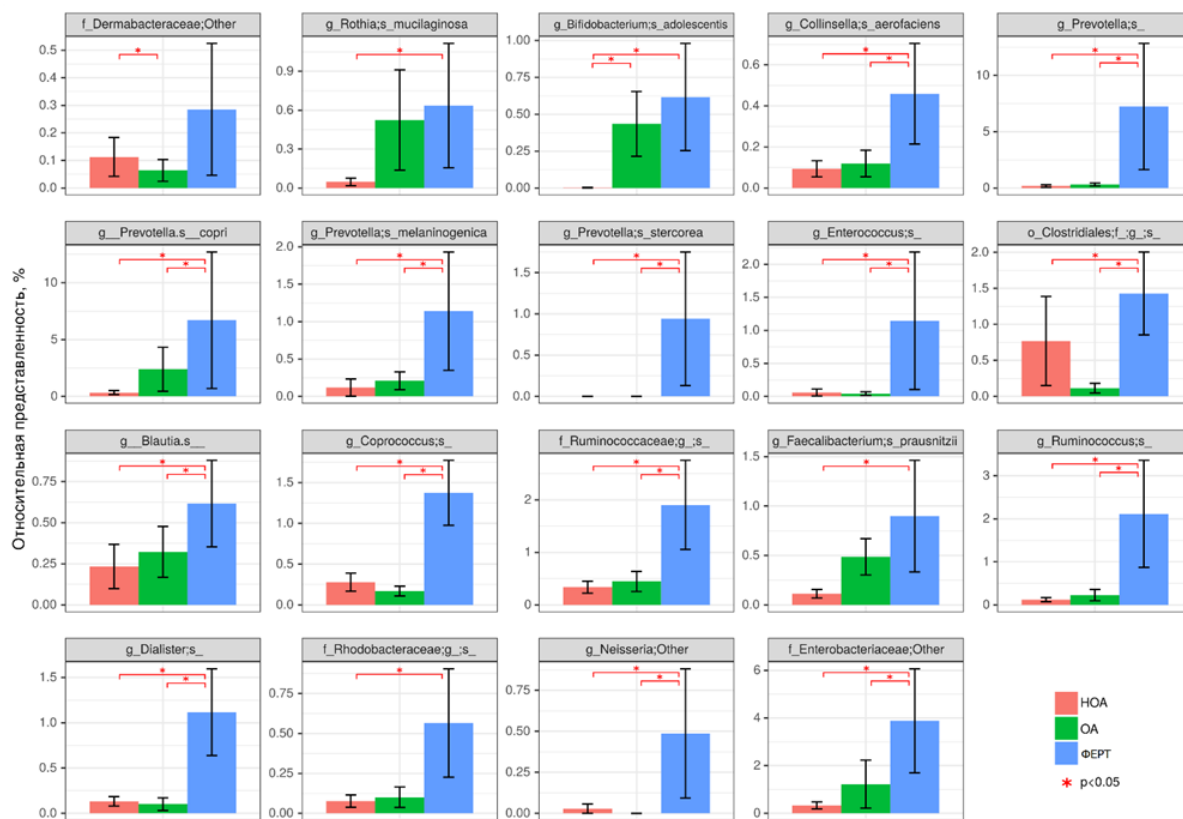


Рисунок 11.7. Статистически значимо отличающиеся между группами сравнения виды, обнаруженные в микробиоте ткани яичка

Наиболее значительные различия между исследуемыми группами были выявлены в процессе анализа отдельных видов микробиома тестикулярной ткани.

Интересным аспектом является то, что группы мужчин с необструктивной азооспермией (НОА) и обструктивной азооспермией (ОА) различаются преимущественно по наличию вида *Bifidobacterium adolescentis*. Этот вид, известный своей ролью в поддержании здоровья и функциональности кишечного микробиома, также может иметь влияние на репродуктивную систему, учитывая его возможное участие в обменных процессах (см. рис. 11.7).

Следует особо акцентировать внимание на том, что сравнительный анализ микробиоты между различными группами пациентов выявил значимые различия в представленности основных групп (филов) микроорганизмов. В частности, фил *Proteobacteria* продемонстрировал достоверное увеличение своей относительной представленности среди пациентов с необструктивной азооспермией (НОА). Эта группа включает широкий спектр патогенных и непатогенных бактерий, многие из которых известны своей способностью индуцировать воспалительные процессы, что может негативно сказываться на репродуктивном здоровье и функциональности яичка.

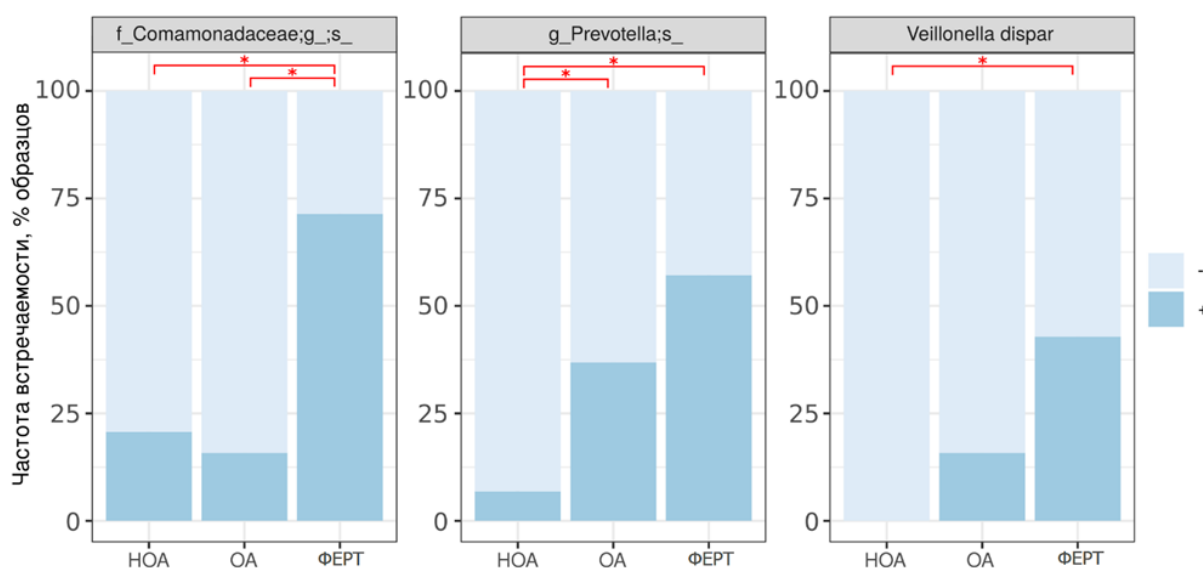


Рисунок 11.8. Частота встречаемости бактерий общих и для уретры, и для ткани яичка, с использованием точных критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини-Хохберга)

Кроме того, при сравнении группы НОА и фертильных мужчин (группа ФЕРТ) также наблюдается статистически значимое снижение количества неопределенных представителей семейства Comamonadaceae, неопределенного представителя рода *Prevotella* и вида *Veillonella dispar* в группах с азооспермией. Эти данные свидетельствуют о том, что микробный состав у мужчин

с азооспермией может значительно отличаться от такового у фертильных мужчин, что открывает новые перспективы для исследования влияния микробиоты на репродуктивные функции.

С другой стороны, в группе обструктивной азооспермии (ОА) отмечено, что неопределенный представитель семейства *Comamonadaceae* также встречается достоверно реже по сравнению с фертильными мужчинами из группы ФЕРТ. Это указывает на возможную роль этого семейства бактерий в поддержании репродуктивного здоровья и их потенциальное значение в патогенезе обструктивной азооспермии (см. рис. 11.8).

11.4. Обсуждение и выводы

В ходе обсуждения и руководствуясь данными мировой литературы, мы пришли к единому мнению, что именно использование передового метода секвенирования нового поколения (NGS) представило возможность качественно проанализировать микробиом мужской половой системы и определить его уникальный состав. Несмотря на существующее сходство между тестикулярным и уретральным микробиомом, большее альфа-разнообразие бактериального сообщества в группах сравнения выявлено в тестикулярной ткани¹¹⁸. Достоверное происхождение бактерий в ткани яичка пока еще неясно, и мы не можем с уверенностью утверждать, временная ли это колонизация или статичная резидентная флора.

Таксономическая структура микробиоты мужчины с необструктивной азооспермией (НОА) имеет большую бактериальную нагрузку на ткани яичка по сравнению с пациентами, страдающими обструктивной азооспермией (ОА) и фертильными (ФЕРТ), в которых доминируют актинобактерии и фирмикуты.

Мужчины с НОА имеют пониженное таксономическое разнообразие, возникшее вследствие истощения *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* и преобладания филы *Proteobacteria*, но вместе с тем в уретре наибольшую бактериальную представленность имели пациенты группы ФЕРТ.

Важно учитывать, что все пациенты проживали в одном регионе и не получали антибиотикотерапию в течение 3 месяцев до исследования, но не исключено, что был отмечен прием антибактериальной терапии у данной группы в процессе лечения и обследования по поводу мужского бесплодия, в течение

¹¹⁸ Фаниев М. В., Кадыров З. А., Дружинина Н. К., Степанов В. С., Прокопьев Я. В., Федоренко Т. В. Сравнительная характеристика тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле. Экспериментальная и клиническая урология 2023; 16(4):80–91; doi: 10.29188/2222-8543-2023-16-4-80-91.

последних трех лет. Тем не менее работы Weidner et al. (2020) по антибактериальной терапии при мужском бесплодии демонстрируют, что целенаправленная коррекция микробиома может улучшать параметры сперматогенеза, снижением уровня лейкоцитоспермии и увеличением частоты естественного зачатия на 18–27% в супружеских парах¹¹⁹.

Современные исследования в области популяционной генетики мужского бесплодия, в частности работа Krausz и Riera-Escamilla (2018) *Genetics of male infertility*, выявили ключевые генетические факторы, ассоциированные с развитием азооспермии. Авторы демонстрируют, что 15–20% случаев НОА обусловлены хромосомными aberrациями (AZF-микроделеции, кариотипные аномалии), а 30% имеют моногенную природу (мутации в NR5A1, DMRT1, TEX11 и др.). В свою очередь, полигенные формы связаны с локусами, регулирующими сперматогенез.

Микробиом-генетические взаимодействия: гены иммунного ответа (TLR, NOD-подобные рецепторы) модулируют восприимчивость к бактериальной колонизации. Вариации в генах антиоксидантной защиты (SOD, GPX) могут усиливать повреждающее действие микробных метаболитов и имеют свои популяционные особенности. Так, например, частота AZF-микроделеций варьирует от 3% (Европа) до 18% (Южная Азия), что требует учета в диагностике. Локусы 5p15.33 и 6p21.32 ассоциированы с НОА в азиатских популяциях¹²⁰.

Опираясь на полученные результаты, мы можем начать диалог о связях между составом микробиоты и фертильностью, и параллельно пролить свет на патологические изменения микробной палитры тестикул при азооспермии.

В ходе проведенного анализа было установлено, что в группе пациентов с необструктивной азооспермией (НОА) наблюдается сниженная частота обнаружения неопределенного представителя рода *Prevotella* по сравнению с группой пациентов, страдающих от обструктивной азооспермии (ОА). Эти результаты подразумевают потенциальную роль данного рода микроорганизмов в патогенезе азооспермии и могут указать на возможные механизмы, способствующие развитию необструктивной формы заболевания.

Необходимо отметить, что данные, приведенные в исследовании Campisciano G. и соавторами, подчеркивают связь между представленностью *Prevotella* и нарушениями подвижности сперматозоидов у пациентов, у которых был обнаружен этот микроорганизм. Кроме того, *Prevotella* также была

¹¹⁹ Weidner W., Pilatz A., Diemer T., Schuppe H. C. (2020) Male genital tract inflammation and sperm quality. In: Parekattil S., Agarwal A. (eds) *Male Infertility*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-32300-4_32.

¹²⁰ Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369–384 (2018). doi: 10.1038/s41585-018-0003-3.

идентифицирована в группе пациентов с идиопатическим мужским бесплодием, что, вероятно, свидетельствует о значимой роли этого микроорганизма в формировании различных форм мужского бесплодия.

Таким образом, снижение уровня *Prevotella* у пациентов с необструктивной азооспермией может указывать на его потенциальное значение как биомаркера, помогающего понять механизмы, стоящие за этой формой бесплодия. Это подчеркивает необходимость дальнейших исследований для более глубокого анализа роли *Prevotella* в контексте фертильности и его возможного влияния на патофизиологические процессы, способствующие снижению репродуктивной функции у мужчин¹²¹.

Интересные различия были обнаружены между группой НОА и группой ФЕРТ: неопределенные представители семейства *Comamonadaceae*, неопределенного рода *Prevotella* и вида *Veillonella dispar* обнаруживались чаще в группе НОА. В группе ОА также было обнаружено снижение обнаружения неопределенного представителя семейства *Comamonadaceae*, по сравнению с группой ФЕРТ.

Полученные нами результаты не разнятся с данными международных исследований, показывающих, что микробиота уретры и микробиота яичка имеют своеобразные составы и отличаются друг от друга. Сложившаяся ситуация прямо указывает на различие в таксономической структуре микробиоты в этих группах и говорит о возможной связи семейства *Comamonadaceae* с обструктивной формой азооспермии. Veneruso I., Cariatì F., Alviggi C. и соавторы отмечают изменения свойств спермы, ассоциирующиеся с наличием *Comamonadaceae*¹²².

Таким образом, различия в представленности основных филов указывают на возможные патофизиологические механизмы, связанные с репродуктивной функцией, и поддерживают предположение о том, что дисбаланс в микробиоте может служить одним из факторов, способствующих развитию азооспермии.

¹²¹ Campisciano G., Iebba V., Zito G., Luppi S., Martinelli M., Fischer L. et al. *Lactobacillus iners* and *gasseri*, *Prevotella bivia* and HPV Belong to the Microbiological Signature Negatively Affecting Human Reproduction. *Microorganisms*. 2020 Dec 25; 9(1):39. doi: 10.3390/microorganisms9010039.

¹²² Veneruso I., Cariatì F., Alviggi C. et al. Metagenomics Reveals Specific Microbial Features in Males with Semen Alterations. *Genes* (Basel). 2023 Jun 6; 14(6):1228. doi: 10.3390/genes14061228.

Глава 12. Сравнительная характеристика структуры микробиоты тестикул и уретры у пациентов с различными видами азооспермией и пациентов и сопутствующим варикоцеле

12.1. Введение и актуальность

Важно отметить, что в контексте бесплодия «вина» мужчин составляет около 50% всех зарегистрированных случаев. Множество исследований подчеркивают, что это негативное явление тесно связано с изменением характеристик микробиоты в эякуляте, что, в свою очередь, прямо коррелирует с такими параметрами сперматозоидов, как их количество, подвижность и морфология¹²³. Данная связь показывает, как микробиом может воздействовать на репродуктивное здоровье и качество спермы, что требует дальнейшего обсуждения и изучения.

Согласно данным современных эпидемиологических исследований, варикоцеле сохраняет за собой статус одной из наиболее частых патологий среди мужчин репродуктивного возраста и ключевой излечимой причиной приобретенного мужского бесплодия¹²⁴. Распространенность варикоцеле в общей мужской популяции составляет около 15–20%, демонстрируя рост, вероятно, связанный с совершенствованием методов диагностики¹²⁵. Особую клиническую значимость заболевание приобретает в андрологической практике. Среди мужчин с первичным бесплодием клинически значимое варикоцеле выявляется у 35–45% пациентов, а среди мужчин со вторичным бесплодием — до 70–81%, что подчеркивает его прогрессирующее негативное влияние на фертильность¹²⁶.

Современные исследования подтверждают, что патоспермия любой степени тяжести, включая тяжелую олигозооспермию и некрозооспермию, не является противопоказанием к хирургическому лечению, а напротив, составляет

¹²³ Gachet C., Prat M., Burucoa C., Grivard P., Pichon M. Spermatic Microbiome Characteristics in Infertile Patients: Impact on Sperm Count, Mobility, and Morphology. *J Clin Med*. 2022 Mar 9; 11(6):1505. doi: 10.3390/jcm11061505. PMID: 35329834; PMCID: et al. (2019). The role of varicocele in male infertility: current concepts and future perspectives. *Andrologia*, 51(1), e13189.

¹²⁴ Jensen C. F. S. et al. (2022). Varicocele and male infertility: a new meta-analysis and review of the impact of varicocele repair on pregnancy rates. *Current Opinion in Urology*, 32(1), 82–89.

¹²⁵ Pilatz A. et al. (2019). The role of varicocele in male infertility: current concepts and future perspectives. *Andrologia*, 51(1), e13189.

¹²⁶ Gorelick J. I., Goldstein M. (1993). Loss of fertility in men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 59(3), 613–616.

ключевое показание для оперативного вмешательства¹²⁷. Как демонстрируют результаты метаанализов и проспективных исследований, микрохирургическая субингвинальная варикоцелэктомия остается золотым стандартом лечения. Отмечается улучшение концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов в среднем на 40–60%, а также повышение частоты наступления естественной беременности у партнерш на 30–45% по сравнению с контрольными группами¹²⁸.

Это состояние заслуживает особого внимания, поскольку оно представляет собой сосудистое расстройство, проявляющееся в виде аномального расширения, удлинения и извитости вен лозовидного сплетения семенного канала. Данная патология не ограничивается лишь морфологическими изменениями; она запускает каскад патофизиологических процессов, включая венозный застой, нарушение терморегуляции мошонки, гипоксию и оксидативный стресс в тканях яичка. Эти изменения зачастую приводят к болевому синдрому, дискомфорту и, что наиболее важно, к прогрессирующей дисфункции яичек, в конечном итоге оказывая глубокое негативное влияние на фертильность. В результате обследования пациентов с варикоцеле лабораторные исследования демонстрируют патологии как качественных, так и количественных характеристик эякулята, выражающиеся в олигозооспермии, астенозооспермии и тератозооспермии.

Для углубленного понимания метаболических основ нарушений сперматогенеза при варикоцеле и оценки эффективности лечения было проведено проспективное исследование, дизайн которого включал сравнительный анализ метаболомного профиля семенной плазмы. В работе Zhang et al. (2022) когорта из 30 пациентов с пальпируемым варикоцеле и олиго- и/или астенозооспермией была сопоставлена с 30 фертильными мужчинами из контрольной группы. Метаболический анализ с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения и масс-спектрометрии (LC-MS) был проведен до операции и через 3 месяца после микрохирургической варикоцелэктомии (МВ). Результаты выявили значительные нарушения в метаболизме липидов и энергетическом обмене у пациентов с варикоцеле, в частности, аномальные уровни лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов и жирных кислот, что напрямую связывает оксидативный стресс с повреждением сперматозоидов. Принципиально важно, что после успешного хирургического лечения у пациентов не

¹²⁷ Cannarella R. et al. (2023). The effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *The World Journal of Men's Health*, 41(1), 1–15.

¹²⁸ Baazeem A., Zini A. (2018). Microsurgical varicocelectomy for the treatment of clinical varicocele: an update. *Asian Journal of Andrology*, 20(2), 101–105.

только улучшились стандартные параметры спермограммы, но и была зафиксирована частичная или полная нормализация 17 ключевых метаболитов, что объективно подтверждает восстановление метаболической среды, необходимой для нормального сперматогенеза, и предоставляет биохимическое обоснование эффективности МВ¹²⁹.

Европейская ассоциация урологов (EAU) в своих современных клинических рекомендациях по мужскому бесплодию дает строгую рекомендацию (уровень доказательности 1a) по проведению лечения варикоцеле (предпочтительно микрохирургическим методом) бесплодным мужчинам с клинически пальпируемым варикоцеле, имеющим аномальные показатели спермы, при условии отсутствия других установленных причин бесплодия Minhas S. et al. (2021). Следует отметить, что, как и во многих руководствах, термин «аномальные параметры спермы» намеренно оставлен без строгого количественного определения, что позволяет клиницисту принимать решение на основе комплексной оценки всех параметров эякулята (концентрация, подвижность, морфология) в контексте конкретного пациента¹³⁰. Данная сильная позиция EAU основана на убедительных доказательствах, полученных в результате крупных метаанализов, которые продемонстрировали статистически значимое и клинически важное улучшение всех ключевых параметров спермограммы после варикоцелэктомии.

Метаанализ, проведенный Baazeem et al. (2011), обобщив данные релевантных исследований, показал достоверное увеличение концентрации сперматозоидов на $12,32 \times 10^6/\text{мл}$, общей подвижности на 10,86% и прогрессивной подвижности на 9,69%. Эти выводы были подтверждены и усилены в более поздних работах, которые также зафиксировали улучшение морфологии сперматозоидов в среднем на 3,16%¹³¹.

Важно подчеркнуть, что хотя абсолютные цифры могут показаться скромными, для мужчин с тяжелыми формами олиго— и астенозооспермии такое улучшение часто имеет критическое значение, переводя их в категорию с более благоприятным прогнозом для естественного зачатия или повышая шансы на успех вспомогательных репродуктивных технологий. Таким образом,

¹²⁹ Zhang X., Deng C., Liu W., Liu H., Zhou Y., Li Q., Zheng H., Wang Q., Jiang M., Pang T., Ma C., Huang C., Zhao Q., Tang Y. Effects of varicocele and microsurgical varicocelectomy on the metabolites in semen. *Sci Rep.* 2022 Mar 25; 12(1):5179. doi: 10.1038/s41598-022-08954-y. PMID: 35338186; PMCID: PMC8956711.

¹³⁰ Minhas S., Bettocchi C., Boeri L. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol.* 2021; 80(5):603–620. doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014.

¹³¹ Baazeem A., Belzile E., Ciampi A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol.* 2011; 60(4):796–808. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.018.

рекомендации EAU подкреплены не только статистической значимостью, но и очевидной клинической пользой вмешательства, направленного на устранение одной из основных исправимых причин мужского бесплодия.

Особую диагностическую и клиническую проблему представляет идиопатическая необструктивная азооспермия (ИНА), на долю которой, по данным современных исследований, приходится порядка 10–15% всех случаев мужского бесплодия¹³². Под ИНА понимают отсутствие сперматозоидов в эякуляте вследствие нарушения сперматогенеза при отсутствии явных обструкций семявыносящих путей и при невозможности установить конкретную этиологию с помощью стандартных диагностических алгоритмов¹³³. Ограниченность современных диагностических возможностей зачастую не позволяет выявить малозаметные генетические, эпигенетические или молекулярные дефекты, лежащие в основе нарушения сперматогенеза¹³⁴. Считается, что в основе ИНА лежит многофакторная этиология, представляющая собой сложное взаимодействие не до конца изученных генетических предрасположенностей (например, нарушения в генах, ассоциированных с мейозом или делением клеток), эндокринных дисфункций, влияния факторов окружающей среды (эндокринные дисапоры, оксидативный стресс) и образа жизни (хронический стресс, диета, курение, употребление алкоголя)¹³⁵. Дальнейшее изучение молекулярных основ сперматогенеза является ключом к уменьшению доли случаев, классифицируемых как идиопатические. Одной из причин, по которой идиопатическое бесплодие остается загадкой, является наличие многофакторной этиологии, включающей генетические, эндокринные и средовые факторы. В некоторых исследованиях также отмечается, что изменения в образе жизни могут играть значительную роль в возникновении идиопатического бесплодия у мужчин^{136, 137}.

¹³² Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369–384 (2018). doi: 10.1038/s41585-018-0003-3.

¹³³ Schlegel P. N., Sigman M., Collura B., De Jonge C. J., Eisenberg M. L., Lamb D. J., Mulhall J. P., Niederberger C., Sandlow J. I., Sokol R. Z., Spandorfer S. D., Tanrikut C., Treadwell J. R., Oristaglio J. T., Zini A. (2021). Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. Fertility and Sterility, *115*(1), 54–61. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.015.

¹³⁴ Hotaling J. M., Carrell D. T. (2021). Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*, *9*(2), 595–605. doi: 10.1111/andr.12938.

¹³⁵ Oud M. S., Smits R. M., Smith H. E., Mastroianni F. K., Holt G. S., Houston B. J., de Vries P. F., Alobaidi B. K. S., Batty L. E., Ismail H., Zahra N., Zia M., Zia S., Zohaib A., Zaman R., Zaman Q., Zaman M., Zaman M., ... Veltman J. A. (2022). A systematic review and standardized clinical validity assessment of genes involved in female and male infertility. *Human Reproduction Update*, *28*(4), 554–580.

¹³⁶ Knez J., Vlaisavljević V. Ženskaneplođnost. In: Takač I., Geršak K., eds. *Ginekologija in perinatologija*. 1st edn. Maribor: Medicinskafakulteta; 2016. p. 170–9. (in Slovene).

¹³⁷ Raheem A., Ralph D. Male infertility: causes and investigations. *Trends Urol Men's Health*. 2011; 2(5):8–11. doi: 10.1002/tre.216.

Многофакторная этиология идиопатического фактора мужского бесплодия, включая инфекции урогенитального тракта, которые не всегда подвергаются корректному этиологическому лечению. Зачастую это связано с отсутствием адекватных диагностических тестов, так как в рутинной практике до сих пор превалируют культуральные методы исследования, а также ПЦР-диагностика, не всегда способная определить весь таксономический микробный спектр диагностического поиска.

В свою очередь, исследования *in vitro* выявили несколько механизмов, через которые бактерии могут влиять не только на нарушение процесса сперматогенеза, но также оказывать негативное влияние на основные функции семенной жидкости^{138, 139}. В настоящее время воздействие бактериальных таксонов формируется в виде нарушения определенных функций. Например, такие как *Escherichia coli* и *Ureaplasma urealyticum*, как наиболее часто диагностируемые в рутинной клинической практике, могут влиять на следующие параметры:

1. Агглютинация сперматозоидов. Бактерии могут выделять адгезивные молекулы, приводящие к агглютинации сперматозоидов, что препятствует нормальному движению спермы и снижает ее способность к оплодотворению. Это может уменьшить количество сперматозоидов, достигающих яйцеклетки, что снижает шансы на зачатие.

2. Индукция апоптоза. В некоторых случаях инфекция может активировать механизмы апоптоза в сперматозоидах и сперматогониях (клетках, ответственных за сперматогенез). Это может происходить через активацию клеточных сигнальных путей, таких как путь контрольных точек клеточного цикла или через выработку воспалительных цитокинов, способствующих гибели клеток.

3. Выработка факторов иммобилизации. Некоторые микроорганизмы могут выделять факторы, которые снижают подвижность сперматозоидов. Это взаимодействие может происходить за счет изменения вязкости семенной жидкости или через дополнительное влияние на моторику сперматозоидов, что затрудняет их движение.

4. Нарушение акросомальной реакции. Акросомальная реакция — это процесс, при котором сперматозоид высвобождает ферменты из акросомы, необходимые для проникновения в оболочку яйцеклетки. Инфекции могут влиять на эту реакцию, приводя к ее недостаточной или неправильной активации.

¹³⁸ Villegas J., Schulz M., Soto L., Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis*. 2005 Jan; 10(1):105-10. doi: 10.1007/s10495-005-6065-8. PMID: 15711926.

¹³⁹ Kaur S., Prabha V. Receptor mediated amelioration of the detrimental effects of sperm agglutinating factor on sperm parameters. *Andrology*. 2013 Jul; 1(4):624-31. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00088.x. Epub 2013 May 8. PMID: 23657873.

Это может произойти из-за изменения внутренней среды в семенной жидкости, вызванного воспалением или наличием токсинов.

5. Воспаление и окислительный стресс. Инфекции могут приводить к хроническому воспалению, вызывающему окислительный стресс в половых клетках. Окислительный стресс может повреждать ДНК сперматозоидов и нарушать их функцию. Высокие уровни реактивных форм кислорода (РФК) инициируют липидную перекисидацию в клеточных мембранах, что приводит к ухудшению подвижности и функциональных характеристик сперматозоидов.

6. Изменения в микробиоме. Инфекции также могут приводить к существенным изменениям в микробиоме, что влияет на местный иммунитет и может затруднять нормальные репродуктивные процессы.

Совместное действие этих механизмов может значительно ухудшить сперматогенез и функциональность сперматозоидов, что, в свою очередь, приводит к бесплодию^{140, 141, 142}. Знание этих процессов может помочь в разработке более эффективных методов диагностики и лечения мужского бесплодия, а также в профилактике воспалительных заболеваний, способствующих бесплодию.

Каждый микробиом уникален и варьируется в зависимости от многих факторов, таких как место обитания (кожный, кишечный, урогенитальный и др.), возраст, пол, диета, образ жизни и окружение. Например, кишечный микробиом состоит из триллионов бактерий, которые играют ключевую роль в пищеварении, метаболизме и поддержании иммунной системы. Он также участвует в синтезе витаминов и других необходимых для организма нутриентов. С точки зрения генетического материала, микробиом человека включает в себя множество генов, которые в сотни раз превышают количество генов в человеческом геноме. Согласно оценкам, количество генов микробиома может достигать 3 миллионов, в то время как в человеческом геноме их около 20–25 тысяч. Эта богатая генетическая палитра позволяет микробиому выполнять разнообразные функции, которые недоступны самому человеку.

¹⁴⁰ Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer M. A. *Ureaplasmaurealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Hum Reprod. 1998 Oct; 13(10):2756-61. doi: 10.1093/humrep/13.10.2756. PMID: 9804226.

¹⁴¹ Boguen R., Treulen F., Uribe P., Villegas J. V. Ability of *Escherichia coli* to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. FertilSteril. 2015 May; 103(5):1155-61. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.044. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25747129.

¹⁴² Maps Geo-Q. The effect of *Ureaplasmaurealyticum* on the level of P34H expression, the activity of hyaluronidase, and DNA fragmentation in human spermatozoa. Am J ReprodImmunol. 2017; 77(1):e12600.

Например, микробиом может метаболизировать сложные углеводы в короткоцепочечные жирные кислоты, которые являются ценным источником энергии для клеток кишечной стенки¹⁴³.

Долгое время считалось, что мужская уретра стерильна, и ее таксономическая структура формируется до начала половой жизни, однако вследствие изучения бактериальных сообществ наружных мужских гениталий и уретры в гетеросексуальных парах, была установлена связь с наличием бактериального вагиноза у партнерш, что показало наличие вариативности микробиома уретры, в зависимости от внешних факторов¹⁴⁴.

Тестикулярная ткань занимает важное место в изучении структуры микробиоты урогенитального тракта, чему способствуют определенные сложности, возникающие при заборе материала и диагностических процедурах. Эти трудности обусловлены необходимостью инвазивных методов, что делает исследования более сложными и менее доступными. В связи с чем многие клинические исследования сосредоточены на анализе показателей эякулята, который служит индикатором состояния репродуктивного здоровья мужчин и может отражать наличие микроорганизмов.

При исследовании микробиологического состава семенной жидкости важно понимать, какие микроорганизмы могут присутствовать в этом биологическом материале, так как они могут оказывать влияние на репродуктивное здоровье и общее состояние организма. Наиболее часто выделяются три основные группы бактерий: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*

Рассмотрим каждую из них подробнее:

— *Enterobacteriaceae* — большая семья грамотрицательных бактерий, включающая такие роды, как *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* и другие. Эти бактерии являются нормальными обитателями кишечника человека и животных, однако некоторые из них могут быть патогенными.

В семенной жидкости *Enterobacteriaceae* могут указывать на нарушения в микробиоме или инфекции. Патогенные штаммы, такие как *E. coli*, могут вызывать воспалительные процессы в половых органах и мочевыводящих путях, что может негативно сказаться на фертильности.

— *Streptococcus spp.* — род грамположительных кокков, которые могут быть как патогенными, так и непатогенными. Некоторые виды, такие как

¹⁴³ Clarridge J. E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *ClinMicrobiol Rev.* 2004 Oct; 17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMID: 15489351; PMCID: PMC523561.

¹⁴⁴ Zozaya M., Ferris M. J., Siren J. D., Lillis R., Myers L., Nsuami M. J., Eren A. M., Brown J., Taylor C. M., Martin D. H. Microbiome. 2016 Apr 19; 4:16. doi: 10.1186/s40168-016-0161-6. PMID: 27090518; PMCID: PMC4835890.

Streptococcus agalactiae (группы В), могут быть связаны с инфекциями у новорожденных и проблемами во время беременности.

Присутствие стрептококков в семенной жидкости может свидетельствовать о бактериальной инфекции, которая может привести к воспалению в половых органах. Это может повлиять на качество спермы и общую репродуктивную функцию.

— *Staphylococcus* spp. — грамположительные бактерии, среди которых наиболее известен *Staphylococcus aureus*. Некоторые штаммы этого рода являются патогенными и могут вызывать различные инфекции, включая кожные и системные.

Присутствие их в семенной жидкости чаще всего отражает наличие воспалительного процесса или инфекции в репродуктивной системе. Например, *S. aureus* может вызывать орхит или эпидидимит, что также может негативно сказаться на качестве спермы. Исследование микробиологического состава семенной жидкости важно для диагностики и лечения инфекций, передающихся половым путем (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma* spp, *Chlamydia trachomatis*), *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Morganella morganii* и др., что немаловажно для оценки репродуктивного здоровья.

Понимание роли различных бактерий в этом контексте позволяет лучше подходить к лечению и профилактике заболеваний, связанных с мужской фертильностью¹⁴⁵.

Изучение микробиологических сообществ представляет собой важную область клинической микробиологии и медицины в целом. Существующие методы исследования имеют свои преимущества и ограничения, и выбор метода зависит от конкретных целей исследования, типа образца и ожидаемых результатов. Наиболее рутинным в повседневной клинической практике является культуральный метод¹⁴⁶, который имеет свои преимущества и недостатки. Также следует отметить, что, по мнению Г. А. Осипова и соавт., данная устоявшаяся методика не диагностирует большинство клинически значимых таксонов из числа аэробных актинобактерий, всех анаэробов и других трудно культивируемых микроорганизмов¹⁴⁷. Наиболее прознанной, экономически

¹⁴⁵ Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J. W., Jayasena C. N., Minhas S. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*. 2021 Jan; 9(1):115–144. doi: 10.1111/andr.12886. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32794312.

¹⁴⁶ Кадыров З. А., Степанов В. С., Алдыраков Э. М., Мошеинашвили Ш. Г. Микробиота органов урогенитальной системы. *Урология*. 2021; 6:136–140. doi: 10.18565/urology.2021.6.136–140.

¹⁴⁷ Осипов Г. А., Родионов Г. Г. Микроэкология человека в норме и патологии по данным масс-спектрометрии микробных маркеров. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях* 2013;(2):43–53.

доступной, а также клинически эффективной является ПЦР-диагностика¹⁴⁸. Однако данная методика имеет свои преимущества и недостатки.

Рассмотрим подробнее основные методы исследования микробиологических сообществ.

1. Культуральные методы.

Включают в себя изоляцию и идентификацию микроорганизмов из образцов с использованием различных питательных сред. Они позволяют выделять и культивировать микроорганизмы, что дает возможность их дальнейшего изучения.

Преимущества:

- возможность получить чистые культуры микроорганизмов;
- проведение антибиотикограммы для определения чувствительности к антибиотикам;
- долговременное хранение культур для последующих исследований.

Недостатки:

- не все микроорганизмы могут быть культивированы в лабораторных условиях (например, многие анаэробы и труднокультивируемые организмы);
- требуется значительное время (от нескольких дней до недель) для получения результатов;
- некоторые патогенные микроорганизмы могут находиться в состоянии покоя и не проявлять активности на питательных средах.

2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Метод ПЦР основан на амплификации специфических участков ДНК или РНК микроорганизмов, что позволяет выявлять их наличие даже в малых количествах. ПЦР может быть использована для диагностики инфекций, а также для определения состава микробиомов.

Преимущества:

- высокая чувствительность и специфичность. Позволяет обнаруживать микроорганизмы, присутствующие в низких концентрациях;
- быстрота получения результатов (обычно в течение нескольких часов);
- возможность выявления различных патогенов одновременно с помощью многопараметрической ПЦР.

Недостатки:

- ограниченный спектр. ПЦР требует заранее известной информации о целевых микроорганизмах, что может привести к пропуску невыявленных патогенов.

¹⁴⁸ Рахматулина М. Н., Болдырева М. Н., Липова Е. В., Чекмарев А. С., Галкина И. С. Оценка состава микробиоты мочеиспускательного канала у мужчин с инфекциями, передающимися половым путем. Урология. 2019;(6):31–37.

— потенциальная контаминация образцов может привести к ложноположительным результатам.

— не позволяет определить жизнеспособность микроорганизмов.

3. Современным «золотым стандартом» в исследовании микробиома является высокопроизводительное секвенирование следующего поколения (NGS, next-generation sequencing), основанное на таргетном анализе консервативных геномных локусов, таких как ген 16S рРНК у бактерий¹⁴⁹. Данная методика обеспечивает глубокий качественный и количественный анализ всего микробного сообщества в биологическом образце, позволяя идентифицировать как доминантные, так и малочисленные таксоны, включая некультивируемые и труднокультивируемые виды¹⁵⁰.

Анализ гипервариабельных участков гена 16S рРНК позволяет проводить точную таксономическую классификацию бактерий до уровня рода или вида, что обеспечивает всестороннюю характеристику микробиоты и выявление дисбиотических нарушений¹⁵¹.

Преимущества:

— обширный охват и возможность выявить широкий спектр микроорганизмов, включая труднокультивируемые и новые виды;

— не требует предварительного культивирования, что позволяет анализировать микробиом в его естественном состоянии;

— возможность изучения функциональных свойств микробиомов через метагеномные исследования.

Недостатки:

— высокая стоимость и сложность анализа данных;

— необходимость мощных вычислительных ресурсов для обработки больших объемов информации;

— интерпретация результатов может быть затруднена из-за сложности экосистемы микробиома.

Методы исследования микробиологических сообществ продолжают развиваться, и выбор подходящего зависит от конкретных задач.

Культуральные методы остаются основой для диагностики инфекций, однако их ограничения подчеркивают необходимость использования более

¹⁴⁹ Pollock J., Glendinning L., Wisedchanwet T., Watson M. (2018). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus „Best Practice“ for 16S Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02627-17. doi: 10.1128/AEM.02627-17.

¹⁵⁰ Janda J. M., Abbott S. L. (2020). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.

¹⁵¹ Jovel J., Patterson J., Wang W. et al. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 459. doi: 10.3389/fmicb.2016.00459.

современных методов, таких как ПЦР и секвенирование нового поколения. Целью нашего исследования является изучение, а также сравнение структуры тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле.

12.2. Материалы и методы

В научной работе представлены результаты анализа 107 инфертильных пациентов, страдающих различными формами азооспермии, а также некоторыми случаями сопутствующего варикоцеле. Все участники исследования обратились в Центр репродуктивной и клеточной медицины ГБУЗ ДГКБ г. Краснодара Министерства здравоохранения Краснодарского края. Каждый пациент прошел стандартизированное обследование, что обеспечило единообразие и сопоставимость данных.

Для детального изучения структуры микробиома тестикулярной ткани был выполнен анализ ампликонов бактериального гена 16S рРНК с применением высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS). Для проведения данной методики получен патент на изобретение «Патент РФ № 2810.467 Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин 27.12.2023». Указанная методика позволяет получать точную информацию о составе микробиоты и выявлять возможные патогенные микроорганизмы, которые могут оказывать влияние на репродуктивные функции. Кроме того, для оценки бактериального спектра урогенитального тракта и контроля чистоты исследуемого метода был проведен забор биологического материала из уретры каждого пациента, которому выполнялась процедура microTESE в рамках протокола BPT. Методика microTESE, впервые описанная Schlegel в 1999 году, зарекомендовала себя как более эффективная альтернатива традиционной TESE для извлечения сперматозоидов у мужчин с необструктивной азооспермией (NOA)¹⁵².

В исследование были включены 76 мужчин с подтвержденной азооспермией и сопутствующим варикоцеле в возрасте от 23 до 49 лет (средний возраст $28 \pm 5,1$ года). Эти данные позволяют глубже понять механизмы возникновения азооспермии и разработать более эффективные подходы к лечению бесплодия у мужчин.

Для проведения исследования были определены критерии включения и исключения.

¹⁵² Schlegel P. N. (1999). Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 14:131–135.

Критерии включения:

1. Добровольное информированное согласие: все участники должны были подписать информированное согласие на участие в исследовании, подтверждая свое желание участвовать, осознавая все риски и преимущества.
2. Возраст: пациенты должны быть старше 18 лет, чтобы соответствовать юридическим и этическим нормам участия в медицинских исследованиях.
3. Бесплодие в браке: участники должны были быть в браке более одного года и иметь регулярную половую жизнь без использования средств контрацепции, что указывает на наличие проблем с фертильностью.
4. Азооспермия: подтвержденный диагноз азооспермии, что является основным критерием для включения в исследование.
5. Отсутствие антибактериальной терапии: пациенты не должны были получать антибактериальную терапию в течение трех месяцев, предшествующих началу исследования, чтобы избежать влияния антибиотиков на микробиом.
6. Наличие варикоцеле: варикоцеле должно быть подтверждено ультразвуковым исследованием органов мошонки с доплерографией.

Критериями исключения служили:

1. Онкологическая патология: наличие любой формы рака, что может влиять на репродуктивные функции и общее состояние здоровья.
2. Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП): наличие ИППП, что может негативно сказаться на результатах исследования и репродуктивной функции.
3. Генетические и эндокринные факторы бесплодия: любые известные генетические аномалии или эндокринные расстройства, которые могут влиять на фертильность.
4. Тяжелая соматическая патология: наличие серьезных соматических заболеваний, которые могут повлиять на общее состояние пациента и результаты исследования.
5. Регулярный прием лекарств: прием медикаментов, способствующих развитию бесплодия или гипогонадизма, что может исказить результаты исследования.
6. Повышение концентрации простат специфического антигена (ПСА): уровень ПСА выше 4 нг/мл, что может свидетельствовать о заболеваниях предстательной железы.
7. Психические заболевания: наличие психических расстройств, которые могут повлиять на способность пациента к участию в исследовании.
8. Хронический алкоголизм и наркомания: эти состояния могут существенно влиять на репродуктивную функцию и общее здоровье пациента.
9. Наличие ВИЧ-инфекции: ВИЧ-инфекция может влиять как на здоровье пациента, так и на результаты исследования.

На следующем этапе участники исследования были распределены по группам, в зависимости от вида азооспермии и наличия сопутствующего варикоцеле.

1. Первая группа ($n = 34$) — пациенты с необструктивной азооспермией (НОА).

Группа включает мужчин, у которых не наблюдается нарушения проходимости семявыносящих путей, что может быть связано с различными факторами, такими как генетические аномалии или проблемы с образованием сперматозоидов. НОА является наиболее распространенной формой азооспермии и требует особого внимания для выявления причин и разработки методов лечения.

2. Вторая группа ($n = 21$) — пациенты с обструктивной азооспермией (ОА).

В группу входят мужчины с нарушением проходимости семявыносящих путей, у которых есть «блокировки» или препятствия, препятствующие выходу сперматозоидов. Причины могут включать инфекционные процессы, травмы или хирургические вмешательства в анамнезе.

3. Третья группа ($n = 21$) — пациенты с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле (Var).

Группа состоит из мужчин, у которых одновременно диагностированы НОА и варикоцеле. Варикоцеле может ухудшать репродуктивные функции, поэтому важно изучить его влияние на результаты лечения бесплодия.

Разделение пациентов на группы позволило более детально изучить механизмы возникновения различных форм азооспермии и влияние сопутствующих состояний, таких как варикоцеле, на репродуктивные функции мужчин. Это способствует разработке индивидуализированных подходов к лечению бесплодия и улучшению результатов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Для обработки полученных данных была использована программа QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) — это мощная программа для анализа микробиомных данных, полученных с использованием секвенирования ампликонов, в частности, рибосомой РНК 16S. Версия 1.9.1 и дополненная таксономической базой данных QIIME 2+GreenGenes2 включающая в себя множество инструментов для обработки, анализа и визуализации данных, что делает ее популярной среди исследователей в области микробиологии.

Основные функции QIIME 1.9.1:

1. Обработка данных.

QIIME позволяет проводить предварительную обработку сырых данных секвенирования, включая фильтрацию низкокачественных чтений, удаление адаптеров и объединение парных чтений.

2. Денсификация и кластеризация.

Программа может кластеризовать последовательности на основе их сходства, создавая операционные таксономические единицы (OTU), что позволяет агрегировать похожие последовательности для дальнейшего анализа.

3. Таксономическая классификация.

Используя различные базы данных, такие как Green genes, QIIME может присваивать таксономические метки OTU, что позволяет исследователям определять состав микробиома.

4. Визуализация данных.

QIIME предоставляет инструменты для создания различных графиков и диаграмм, что упрощает интерпретацию результатов.

QIIME2 — это улучшенная версия QIIME, выпущенная с целью устранения ограничений предыдущей версии и предоставления более широких возможностей для анализа микробиомных данных. Она поддерживает более современные методы анализа и имеет модульную архитектуру, что позволяет пользователям добавлять новые плагины для расширения функциональности.

1. Модульность.

QIIME2 имеет модульную архитектуру, что позволяет добавлять плагины для различных типов анализа (например, для анализа метагеномных данных).

2. Улучшенная обработка данных.

Включает в себя более современные алгоритмы для обработки данных и повышения их качества.

3. Поддержка различных форматов данных.

QIIME2 может работать с несколькими форматами входных данных, что делает его более универсальным инструментом.

4. Расширенная таксономическая классификация.

Использование обновленных баз данных, таких как GreenGenes, обеспечивает более точное определение таксонов. База данных Green Genes — это обширная база данных 16S рРНК последовательностей, которая используется для таксономической классификации микробов. Она была специально разработана для поддержки исследований микробиома и предоставляет высококачественные последовательности и соответствующие таксономические метки.

Выбор данных программ (QIIME2 + GreenGenes) был нами обоснован по следующим преимуществам:

1. Точность и надежность: использование QIIME2 в сочетании с базой данных GreenGenes обеспечивает высокую точность определения таксонов благодаря большому количеству хорошо аннотированных последовательностей.

2. Совместимость с новыми методами анализа: QIIME2 поддерживает современные аналитические методы, такие как анализ метагеномных данных и интеграция с другими инструментами для более глубокого анализа микробиома.

3. Улучшенная визуализация и интерпретация данных: QIIME2 предоставляет расширенные возможности визуализации, что облегчает интерпретацию сложных данных о микробиоме.

4. Актуальность базы данных: Green Genes обновляется и поддерживается сообществом, что позволяет использовать самые последние данные о микробах и их аннотациях.

Использование QIIME (версия 1.9.1) в начале исследования обеспечивало надежные результаты на этапе предварительной обработки данных, тогда как переход на QIIME2 с базой данных GreenGenes позволил повысить точность таксономической классификации и глубину анализа микробиологического состава образцов. Это сочетание инструментов обеспечило комплексный подход к исследованию микробиома и позволило получить более точные и воспроизводимые результаты.

12.3. Результаты

Сравнительный анализ структуры микробиоты уретры и тестикул пациентов был проведен на основе средних значений, определенных для различных таксономических уровней, включая типы, филы и семейства. В процессе анализа данные о таксонах, доля которых составила менее 0,5% как минимум в двух образцах, были исключены из дальнейшего рассмотрения.

Таксономический состав микробиоты уретры. При оценке структуры микробиоты уретры можно представить следующим образом (рис. 12.1).

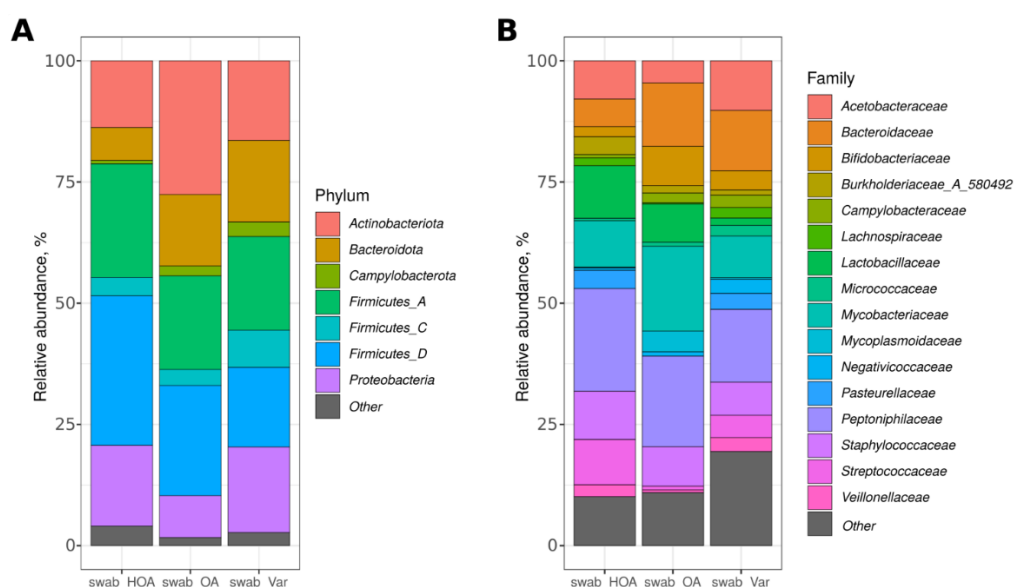


Рисунок 12.1. Таксономический состав микробиоты уретры (по средним значениям в группе). А — на уровне фил, В — на уровне семейств

В ходе проведенного исследования микробиоты уретры у пациентов, разделенных на три группы, были проанализированы различия в микробиологическом составе. Группа 1 (НОА) и группа 2 (ОА) не продемонстрировали достоверных отличий в микробиологическом составе, что свидетельствует о схожести

их микробиоты. Это может указывать на отсутствие значимого влияния факторов, связанных с этими состояниями, на состав микробиоты уретры. В отличие от этого, в группе 3 (Var), состоящей из пациентов с варикозным расширением вен лозовидного сплетения и азооспермией, были выявлены значительные изменения в микробиологическом составе. Достоверно сниженное количество обнаруженных таксонов, а также фил и семейств указывает на возможное влияние варикозного расширения вен на микробиоту уретры.

Эти изменения могут быть связаны с нарушением венозного кровообращения и последующими изменениями в локальной иммунной реакции, что может способствовать изменению состава микробиоты. На рис. 12.2 представлены наиболее значимые различия в относительной представленности таксонов, а табл. 12.1 демонстрирует количественные характеристики изменений, что позволяет более детально оценить вариации в микробиологическом составе между группами.

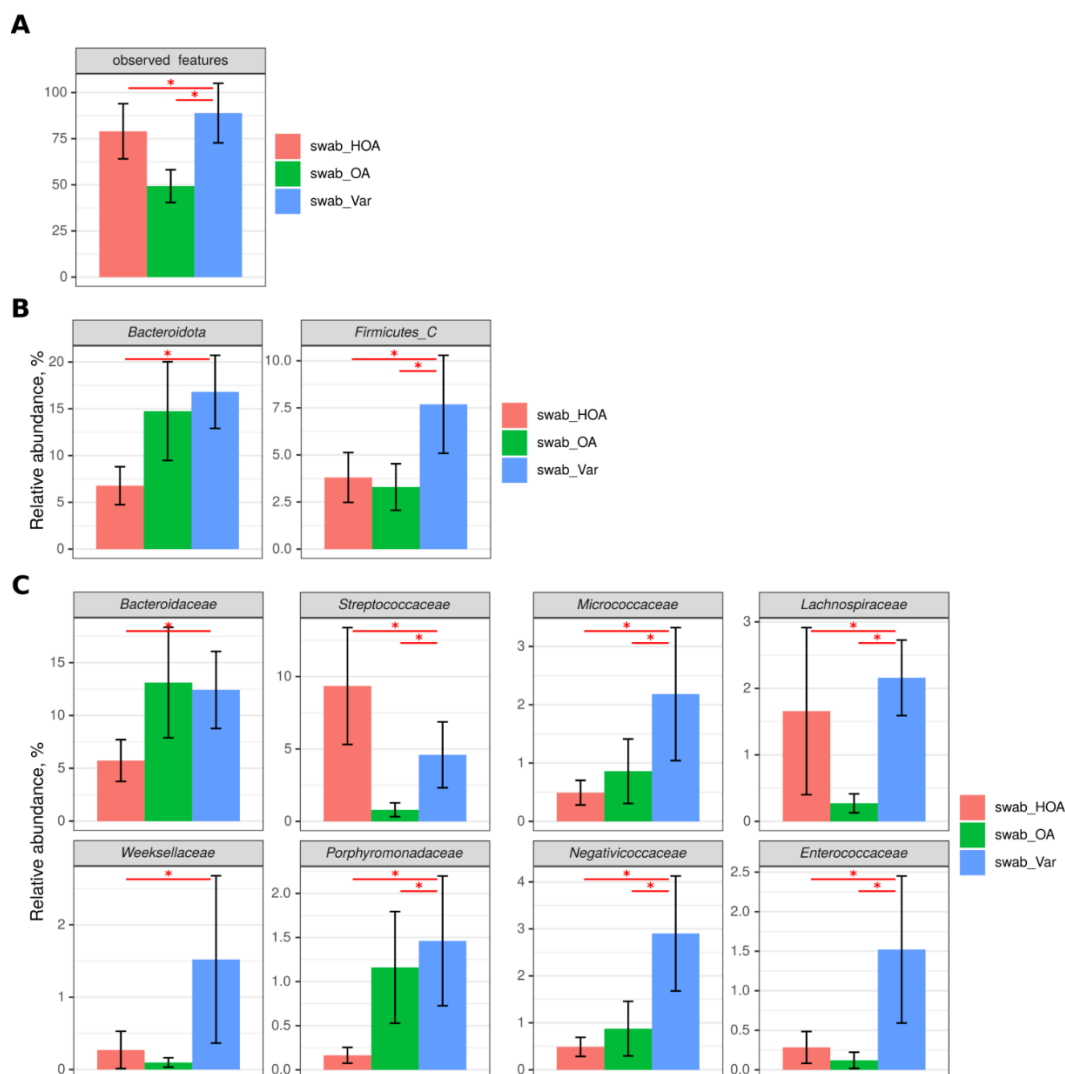


Рисунок 12.2. Достоверные отличия таксономического состава микробиоты уретры. А — разнообразие сообщества, В — филы, С — семейства. *- $p < 0,05$, тест Красскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга

Таблица 12.1. Достоверные различия относительной представленности таксонов в образцах микробиоты уретры

	Среднее ± стандартклон			Pvalue, тест Краскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга		
	swab_HOA	swab_OA	swab_Var	HOA vs OA	HOA vs Var	OA vs Var
Альфа-разнообразие						
observed_features	79,00±87,16	49,29±40,62	88,86±73,96	0,72	0,01	0,02
Филы, %						
Bacteroidota	6,78±11,82	14,75±24,17	16,81±17,91	0,10	<0,01	0,09
Firmicutes_C	3,80±7,74	3,30±5,66	7,69±11,93	1,00	0,02	0,02
Patescibacteria	0,31±1,65	0,01±0,03	0,15±0,33	0,48	0,02	0,02
Fusobacteriota	1,00±3,83	0,04±0,13	0,46±0,84	0,51	0,02	0,02
Desulfobacterota_I	0,00±0,00	0,01±0,06	0,12±0,24	0,56	<0,01	0,01
Семейства, %						
Bacteroidaceae	5,74±11,51	13,12±23,97	12,42±16,71	0,20	0,01	0,19
Streptococcaceae	9,35±23,52	0,80±2,18	4,59±10,41	0,27	0,03	0,01
Micrococcaceae	0,49±1,23	0,86±2,53	2,18±5,22	0,99	0,04	0,04
Lachnospiraceae	1,66±7,33	0,27±0,65	2,16±2,60	0,60	<0,01	<0,01
Weeksellaceae	0,27±1,51	0,10±0,30	1,52±5,30	0,36	0,03	0,18
Porphyromonadaceae	0,16±0,52	1,16±2,90	1,46±3,37	0,21	<0,01	0,03
Acetivibacteraceae	0,03±0,17	0,10±0,24	0,78±1,16	0,15	<0,01	0,01
Ruminococcaceae	0,14±0,67	0,07±0,20	0,30±0,56	0,77	0,04	0,08
Negativicoccaceae	0,49±1,18	0,88±2,66	2,90±5,61	0,99	0,03	0,03
Enterococcaceae	0,28±1,17	0,12±0,47	1,52±4,26	0,82	0,04	0,02
Fusobacteriaceae_993521	0,39±1,99	0,00±0,02	0,37±0,72	0,46	0,01	<0,01
Flavobacteriaceae	0,05±0,27	0,00±0,00	0,06±0,13	0,31	0,12	0,04
Coprobacillaceae	0,08±0,38	0,03±0,12	0,23±0,35	1,00	<0,01	0,01
Brevibacteriaceae	0,12±0,54	0,00±0,00	0,26±0,97	0,29	0,14	0,04
Peptostreptococcaceae_256921	0,09±0,48	0,14±0,59	0,41±0,98	0,29	<0,01	0,06
Oscillospiraceae_88309	0,01±0,04	0,04±0,15	0,17±0,34	0,89	0,03	0,04
Microbacteriaceae	0,22±1,16	0,03±0,11	0,29±0,68	1,00	0,05	0,047
Helicobacteraceae	0,03±0,15	0,01±0,05	0,44±1,22	0,85	0,01	0,02
o__Bacteroidales,f__	0,00±0,00	0,11±0,38	0,15±0,35	0,22	0,01	0,21
Rikenellaceae	0,01±0,03	0,00±0,00	0,30±0,63	0,87	<0,01	<0,01
Desulfovibrionaceae	0,00±0,00	0,01±0,06	0,12±0,24	0,56	<0,01	0,01
o__Christensenellales, f__CAG-74	0,00±0,00	0,02±0,07	0,07±0,18	0,33	0,03	0,23
c__Clostridia_258483, o__UBA1381, f__UBA1381	0,00±0,00	0,00±0,01	0,07±0,19	0,52	0,02	0,08
Tannerellaceae	0,01±0,04	0,00±0,00	0,15±0,40	0,72	<0,01	<0,01

В ходе анализа микробиоты уретры пациентов с различными состояниями, включая группы с (НОА), (ОА) и варикоцеле (Var), были выявлены интересные различия в качественном составе микроорганизмов.

При сравнении качественных данных, касающихся наличия или отсутствия таксонов в образцах, было установлено, что группы НОА и ОА различаются лишь по частоте встречаемости филумов Bacteroidota. Это свидетельствует о том, что, несмотря на общие характеристики микробиоты уретры, определенные изменения в составе могут быть связаны с состоянием азооспермии. Таким образом, наличие или отсутствие представителей данного филума может служить потенциальным маркером для дальнейшего изучения. В группе пациентов с варикоцеле (Var) ситуация выглядит иначе. При сравнении видового состава микроорганизмов с группами НОА и ОА невозможно выделить определенные филы из-за значительного разнообразия таксонов, обнаруженных в образцах. Это разнообразие может быть связано с множеством факторов, включая индивидуальные особенности пациентов, степень заболевания и возможные сопутствующие состояния.

Таблица 12.2. Достоверно отличающиеся частоты встречаемости бактериальных таксонов в уретре в группах сравнения

	Наличие/Отсутствие (% образцов)			Pvalue, точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини-Хохберга		
	swab_HOA	swab_OA	swab_Var	HOA vs OA	HOA vsVar	OA vsVar
Филы						
Bacteroidota	70,6/29,4	100,0/0,0	100,0/0,0	0,01	0,01	1,00
Firmicutes_C	52,9/47,1	57,1/42,9	95,2/4,8	0,79	<0,01	0,01
Fusobacteriota	20,6/79,4	14,3/85,7	52,4/47,6	0,72	0,03	0,03
Desulfobacterota_I	0,0/100,0	4,8/95,2	28,6/71,4	0,38	0,01	0,14
Семейства						
Bacteroidaceae	61,8/38,2	85,7/14,3	95,2/4,8	0,11	0,03	0,61
Burkholderiaceae_A_580492	38,2/61,8	42,9/57,1	76,2/23,8	0,78	0,03	0,09
Streptococcaceae	44,1/55,9	33,3/66,7	81,0/19,0	0,57	0,02	0,01
Lachnospiraceae	35,3/64,7	52,4/47,6	85,7/14,3	0,27	<0,01	0,06
Pseudomonadaceae	17,6/82,4	28,6/71,4	52,4/47,6	0,50	0,04	0,31
Porphyromonadaceae	17,6/82,4	33,3/66,7	71,4/28,6	0,21	<0,01	0,04
Acetivibrioaceae	8,8/91,2	28,6/71,4	61,9/38,1	0,07	<0,01	0,07
Fusobacteriaceae_993521	11,8/88,2	4,8/95,2	42,9/57,1	0,64	0,03	0,03
Coprobacillaceae	8,8/91,2	9,5/90,5	42,9/57,1	1,00	0,02	0,049
Peptostreptococcaceae_256921	5,9/94,1	19,0/81,0	42,9/57,1	0,19	<0,01	0,19
Helicobacteraceae	2,9/97,1	4,8/95,2	28,6/71,4	1,00	0,03	0,14
o__Bacteroidales;_	0,0/100,0	9,5/90,5	23,8/76,2	0,21	0,02	0,41
Rikenellaceae	2,9/97,1	4,8/95,2	38,1/61,9	1,00	<0,01	0,03
Desulfovibrionaceae	0,0/100,0	4,8/95,2	28,6/71,4	0,38	0,01	0,14
Tannerellaceae	2,9/97,1	0,0/100,0	28,6/71,4	1,00	0,03	0,03

Табл. 12.2 иллюстрирует данные о встречаемости различных таксонов в каждой из групп, показывая, что в группе Var наблюдается более широкий спектр микроорганизмов по сравнению с НОА и ОА. Это подчеркивает необходимость более глубокого исследования микробиоты уретры у пациентов с варикоцеле, чтобы определить возможные корреляции между состоянием венозной системы и составом микроорганизмов, а также их влияние на репродуктивное здоровье.

2. Таксономический состав микробиоты ткани яичка

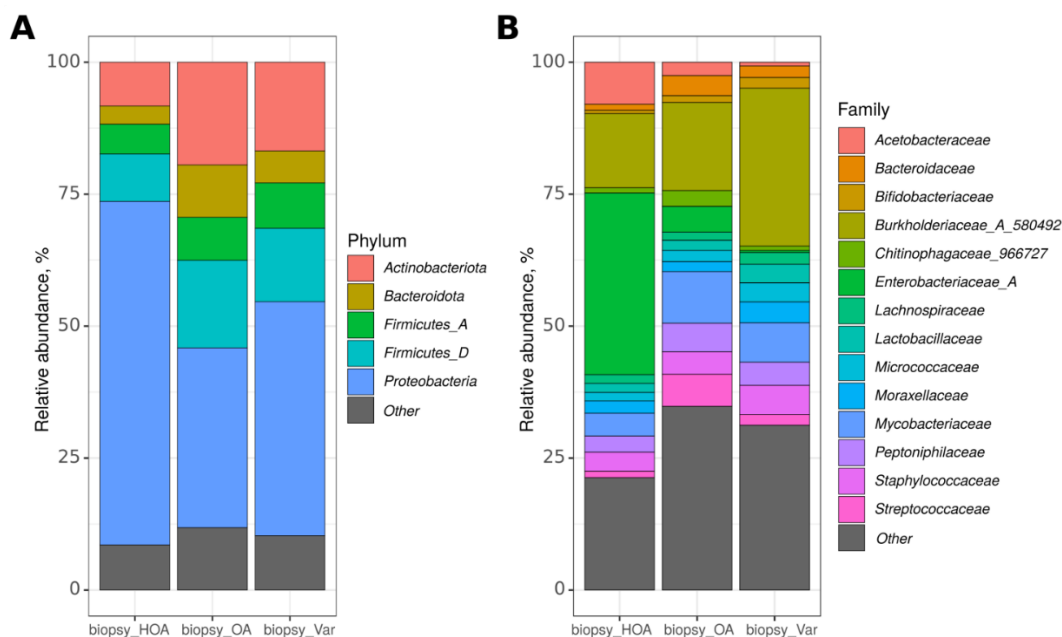


Рисунок 12.3. Таксономический состав микробиоты ткани яичка (по средним значениям в группе). А — на уровне фил, В — на уровне семейств

При исследовании микробиоты яичек у пациентов группах НОА, ОА и варикоцеле были выявлены значительные различия в видовом разнообразии микробиоты. В группе НОА наблюдается снижение видового разнообразия, при этом достоверно отличаются целый ряд таксонов. Интересно, что сравнение микробиоты уретры у пациентов с НОА и ОА выявило сходство в видовом составе, тогда как микробиота яичек пациентов с ОА имеет большее сходство с аналогичной микробиотой пациентов с варикоцеле.

Наиболее представленные и достоверно отличающиеся таксоны микробиоты яичек проиллюстрированы на рис. 12.4, а соответствующие статистические данные приведены в табл. 12.3. Особое внимание следует уделить семейству Enterobacteriaceae_A, представленность которого в среднем превышает 34% в биопсиях группы НОА (рис. 12.3В). Однако несмотря на высокую среднюю представленность, достоверных отличий на уровне более низких таксонов в пределах этого семейства не было выявлено. Это может быть связано

с тем, что у 12 пациентов в группе НОА доля данного семейства составляет более 87%, в то время как у остальных 22 пациентов оно не обнаружено.

В группе пациентов с ОА данный микроорганизм был выявлен только в одном образце, а у пациентов с варикоцеле *Enterobacteriaceae* А не обнаружено вовсе. Эти данные указывают на возможную связь между высоким содержанием *Enterobacteriaceae* А и состоянием репродуктивной системы.

Нужно отметить, что семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя разнообразные грамотрицательные бактерии, которые обычно обитают в кишечнике человека и животных. К наиболее известным родам этого семейства относятся *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Salmonella*. Представители этого семейства могут проявлять патогенные свойства и ассоциироваться с различными инфекциями.

Роль *Enterobacteriaceae*_А в репродуктивных потерях на сегодняшний день можно охарактеризовать следующим образом: дисбаланс микробиоты может приводить к воспалительным процессам, которые, в свою очередь, могут оказывать негативное влияние на репродуктивную функцию через иммунный ответ, что может приводить к аутоиммунным реакциям и увеличивать риск репродуктивных потерь. Таким образом, наличие или отсутствие *Enterobacteriaceae*_А в микробиоте яичек может быть важным фактором для понимания механизма репродуктивных нарушений и требует дальнейшего изучения для установления причинно-следственных связей.

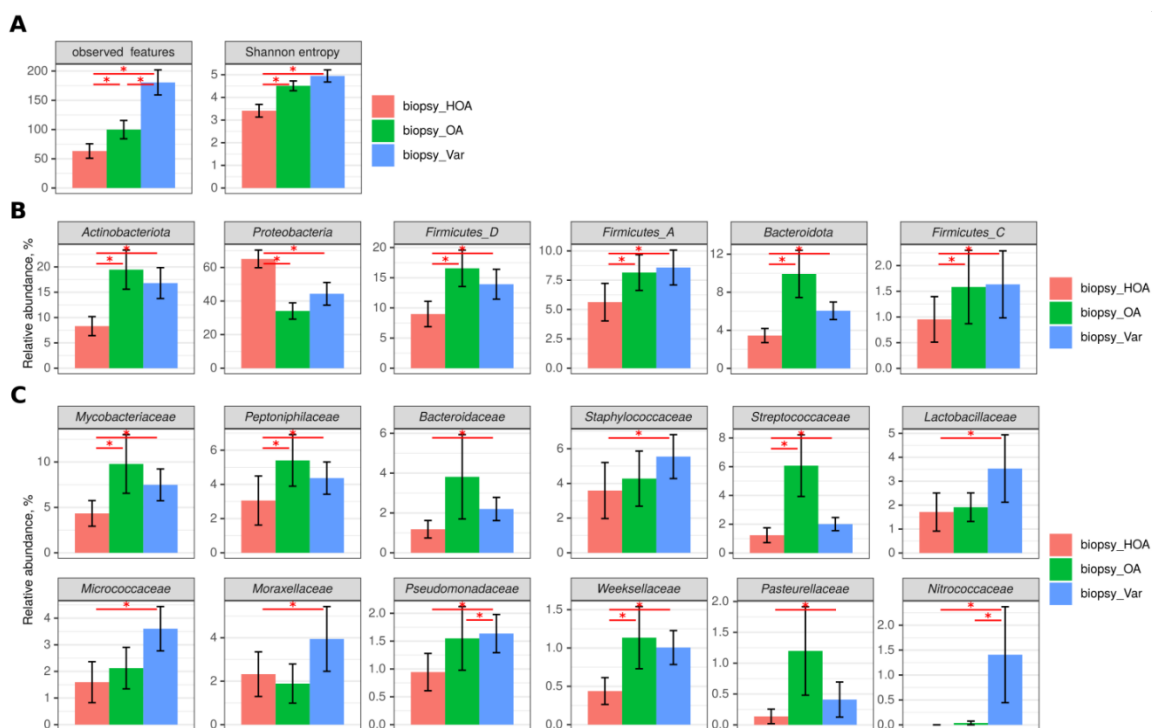


Рисунок 12.4. Достоверные отличия таксономического состава микробиоты ткани яичка. А — разнообразие сообщества, В — филы, С — семейства. *- $p < 0,05$, тест Крассела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга

Таблица 12.3. Достоверные различия относительной представленности таксонов в образцах микробиоты ткани яичка

	Среднее ± стандотклон			Pvalue, тест Краскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга		
	biopsy_HOA	biopsy_OA	biopsy_Var	HOA vs OA	HOA vs Var	OA vs Var
Альфа-разнообразие						
faith_pd	31,59±51,66	46,32±45,78	88,82±81,82	0,046	<0,01	0,08
observed_features	63,32±72,10	99,90±71,98	180,57±98,12	0,04	<0,01	0,02
shannon_entropy	3,41±1,64	4,51±0,98	4,95±1,22	0,047	<0,01	0,21
simpson	0,78±0,16	0,89±0,07	0,86±0,15	0,046	0,02	0,61
Филы, %						
Actinobacteriota	8,30±10,94	19,46±17,71	16,81±13,98	0,01	0,01	0,84
Proteobacteria	65,09±30,60	34,06±22,19	44,32±30,96	<0,01	0,01	0,45
Firmicutes_D	8,99±12,31	16,57±13,85	13,93±11,34	0,03	0,047	0,74
Firmicutes_A	5,63±9,32	8,15±6,97	8,58±6,82	0,049	0,04	0,77
Bacteroidota	3,45±4,33	9,93±11,38	6,05±4,22	0,01	0,01	0,66
Firmicutes_C	0,95±2,58	1,58±3,28	1,63±2,99	0,04	0,04	0,79
Deinococcota	0,14±0,63	0,33±0,80	0,31±0,54	0,17	0,01	0,23
Семейства, %						
Mycobacteriaceae	4,34±8,25	9,78±14,78	7,48±8,01	0,03	0,01	0,97
Peptoniphilaceae	3,06±8,38	5,40±6,90	4,37±4,32	0,01	0,01	0,91
Bacteroidaceae	1,18±2,56	3,81±9,70	2,20±2,66	0,08	0,03	0,57
Staphylococcaceae	3,59±9,42	4,28±7,28	5,55±5,80	0,34	0,02	0,19
Streptococcaceae	1,23±3,01	6,07±9,82	2,01±2,09	<0,01	0,01	0,58
Lactobacillaceae	1,71±4,65	1,91±2,74	3,53±6,46	0,09	0,04	0,58
Micrococcaceae	1,60±4,49	2,12±3,58	3,60±3,82	0,10	<0,01	0,15
Moraxellaceae	2,32±5,99	1,89±4,12	3,94±6,83	0,64	0,02	0,07
Pseudomonadaceae	0,94±1,96	1,55±2,62	1,64±1,57	0,35	<0,01	0,04
Weeksellaceae	0,44±1,02	1,14±1,86	1,01±1,01	0,01	<0,01	0,37
Porphyromonadaceae	0,33±1,36	0,34±0,67	0,48±0,86	0,26	0,02	0,25
Acutalibacteraceae	0,14±0,38	0,58±1,66	0,63±1,07	0,45	0,01	0,07
Dermabacteraceae	0,16±0,46	0,82±1,19	0,17±0,27	0,02	0,25	0,23
Pasteurellaceae	0,14±0,69	1,20±3,29	0,41±1,30	0,12	<0,01	0,19
Sphingomonadaceae	0,42±0,99	0,39±0,98	0,37±0,61	0,36	0,03	0,22
Enterococcaceae	0,07±0,41	0,04±0,18	0,27±0,69	0,86	<0,01	0,01
Flavobacteriaceae	0,11±0,29	0,46±0,69	0,45±0,67	0,07	0,02	0,54
Alcanivoracaceae	0,07±0,40	0,12±0,32	0,49±0,68	0,33	<0,01	0,01
Sphingobacteriaceae	0,04±0,24	0,56±1,94	0,40±0,64	0,24	<0,01	0,02
Beijerinckiaceae	0,56±2,06	0,14±0,55	0,71±1,45	0,28	0,03	0,01
Bacillaceae_H_294103	0,10±0,37	0,01±0,05	0,18±0,24	0,61	<0,01	<0,01
c__Alphaproteobacteria.____	0,11±0,33	0,21±0,48	0,27±0,41	0,37	0,02	0,14
Marinococcaceae	0,04±0,18	0,14±0,44	1,16±2,58	0,41	0,03	0,18
Nitrococcaceae	0,00±0,00	0,04±0,17	1,41±4,41	0,59	<0,01	<0,01
Nanopelagicaceae	0,02±0,08	0,50±0,95	0,01±0,03	<0,01	0,52	0,03
Helicobacteraceae	0,00±0,00	0,03±0,12	0,42±1,83	0,51	0,01	0,04

	Среднее ± стандартклон			Pvalue, тест Краскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга		
	biopsy_HOA	biopsy_OA	biopsy_Var	HOA vs OA	HOA vs Var	OA vs Var
Deinococcaceae	0,13±0,64	0,28±0,88	0,18±0,37	0,17	0,02	0,32
Legionellaceae_A	0,06±0,31	0,27±0,70	0,03±0,13	0,047	0,74	0,09
Gemmatimonadaceae	0,07±0,41	0,18±0,47	0,12±0,56	0,04	0,80	0,07
Propionibacteriaceae	0,05±0,18	0,02±0,08	0,14±0,28	0,98	0,01	0,01
Rhizobiaceae_A_499470	0,02±0,09	0,07±0,32	0,28±0,70	0,76	<0,01	<0,01
Listeriaceae	0,00±0,00	0,06±0,25	0,10±0,26	0,30	0,04	0,27
Vibrionaceae	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,27	1,00	<0,01	<0,01
Gaiellaceae	0,00±0,00	0,21±0,52	0,04±0,18	0,03	0,33	0,23
Blastocatellaceae_430966	0,00±0,00	0,15±0,37	0,01±0,03	0,02	0,52	0,08

Таблица 12.4. Достоверно отличающиеся частоты встречаемости бактериальных таксонов в ткани яичка в группах сравнения

	Наличие/Отсутствие (% образцов)			Pvalue, точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение методом БенджаминиХохберга		
	biopsy_HOA	biopsy_OA	biopsy_Var	HOA vs OA	HOA vs Var	OA vs Var
Филы						
Actinobacteriota	73,5/26,5	95,2/4,8	100,0/0,0	0,11	0,03	1,00
Firmicutes_C	35,3/64,7	66,7/33,3	76,2/23,8	0,04	0,02	0,73
Fusobacteriota	20,6/79,4	33,3/66,7	57,1/42,9	0,35	0,03	0,32
Deinococcota	8,8/91,2	28,6/71,4	47,6/52,4	0,11	0,01	0,34
Семейства						
Mycobacteriaceae	50,0/50,0	85,7/14,3	100,0/0,0	0,01	<0,01	0,23
Peptoniphilaceae	38,2/61,8	81,0/19,0	90,5/9,5	<0,01	<0,01	0,66
Bacteroidaceae	55,9/44,1	81,0/19,0	90,5/9,5	0,12	0,02	0,66
Streptococcaceae	44,1/55,9	76,2/23,8	85,7/14,3	0,04	0,01	0,70
Lactobacillaceae	41,2/58,8	76,2/23,8	85,7/14,3	0,02	0,01	0,70
Micrococcaceae	44,1/55,9	71,4/28,6	95,2/4,8	0,09	<0,01	0,09
Lachnospiraceae	47,1/52,9	57,1/42,9	90,5/9,5	0,58	<0,01	0,049
Aerococcaceae	26,5/73,5	42,9/57,1	66,7/33,3	0,25	0,01	0,25
Veillonellaceae	23,5/76,5	52,4/47,6	61,9/38,1	0,06	0,03	0,76
Moraxellaceae	38,2/61,8	52,4/47,6	85,7/14,3	0,40	<0,01	0,06
Pseudomonadaceae	29,4/70,6	42,9/57,1	95,2/4,8	0,39	<0,01	<0,01
Weeksellaceae	29,4/70,6	66,7/33,3	85,7/14,3	0,02	<0,01	0,28
Neisseriaceae_563222	32,4/67,6	52,4/47,6	76,2/23,8	0,20	0,01	0,20
Porphyromonadaceae	14,7/85,3	28,6/71,4	52,4/47,6	0,30	0,02	0,30
Acutalibacteraceae	23,5/76,5	28,6/71,4	61,9/38,1	0,75	0,03	0,09
Ruminococcaceae	26,5/73,5	33,3/66,7	61,9/38,1	0,76	0,04	0,18
Xanthomonadaceae_616009	29,4/70,6	42,9/57,1	76,2/23,8	0,39	<0,01	0,09

	Наличие/Отсутствие (% образцов)			Pvalue, точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение методом БенджаминиХохберга		
	biopsy_HOA	biopsy_OA	biopsy_Var	HOA vs OA	HOA vs Var	OA vs Var
Pasteurellaceae	5,9/94,1	23,8/76,2	47,6/52,4	0,14	<0,01	0,20
Sphingomonadaceae	20,6/79,4	38,1/61,9	66,7/33,3	0,22	<0,01	0,18
Enterococcaceae	2,9/97,1	4,8/95,2	33,3/66,7	1,00	0,01	0,07
Flavobacteriaceae	20,6/79,4	42,9/57,1	57,1/42,9	0,19	0,03	0,54
Alcanivoracaceae	2,9/97,1	14,3/85,7	47,6/52,4	0,15	<0,01	0,06
Sphingobacteriaceae	2,9/97,1	14,3/85,7	47,6/52,4	0,15	<0,01	0,06
Beijerinckiaceae	23,5/76,5	9,5/90,5	57,1/42,9	0,29	0,03	0,01
Bacillaceae_H_294103	8,8/91,2	4,8/95,2	47,6/52,4	1,00	0,01	0,01
c__Alphaproteobacteria;__;__	17,6/82,4	28,6/71,4	57,1/42,9	0,50	0,01	0,18
Nitrococcaceae	0,0/100,0	4,8/95,2	38,1/61,9	0,38	<0,01	0,03
Nanopelagicaceae	5,9/94,1	38,1/61,9	14,3/85,7	0,01	0,36	0,24
Helicobacteraceae	0,0/100,0	4,8/95,2	23,8/76,2	0,38	0,02	0,28
Deinococcaceae	5,9/94,1	23,8/76,2	38,1/61,9	0,14	0,01	0,51
Propionibacteriaceae	8,8/91,2	9,5/90,5	42,9/57,1	1,00	0,02	0,049
Rhizobiaceae_A_499470	5,9/94,1	9,5/90,5	52,4/47,6	0,63	<0,01	0,01
Vibrionaceae	0,0/100,0	0,0/100,0	23,8/76,2	1,00	0,02	0,07

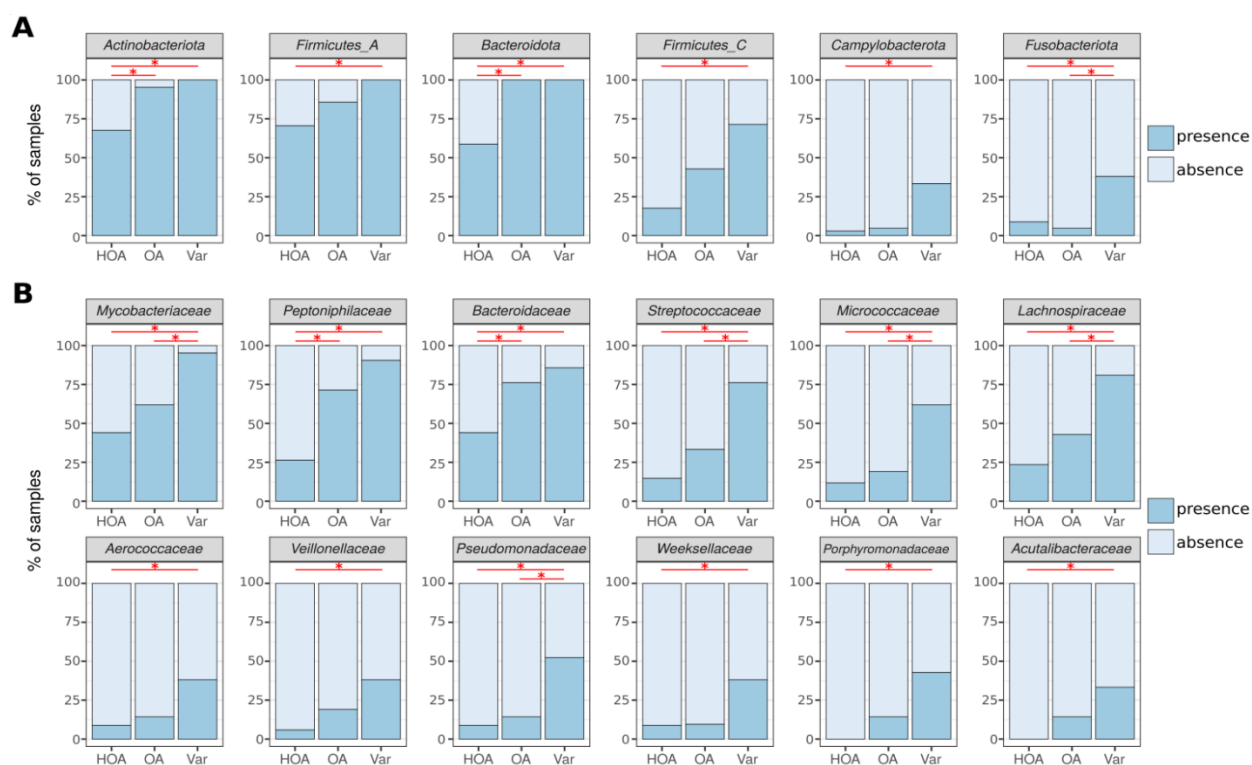


Рисунок 12.5. Достоверно отличающиеся частоты встречаемости бактериальных таксонов, которые обнаруживаются и в урете, и в яичке одновременно. А — филы, В — семейства.

*- $p < 0,05$, точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга

Оценка качественного состава микробиоты яичка у пациентов группы 1 и 2, в сопоставлении с группой 3, показала, что видовой состав микробиоты яичка значительно отличается от последней, а группа 2 занимает промежуточное положение по видовому составу, где наблюдаются подобные бактериальные таксоны в группах сравнения (табл. 12.4).

3. Бактериальные таксоны, которые обнаруживаются как в уретре, так и в ткани яичка.

Далее нами было проведено сравнение частоты обнаружения бактерий, которые присутствуют одновременно в уретре и яичках одного пациента. В результате исследования были выявлены 6 фил и 12 семейств, которые различаются между группами. Наиболее заметные отличия наблюдаются в группе НОА по сравнению с варикоцеле, тогда как группа ОА занимает промежуточное положение (см. рис. 12.5).

12.4. Обсуждение и выводы

В процессе сравнения микробиоты уретры у инфертильных пациентов с различными формами азооспермии, как с сопутствующим варикоцеле, так и без него, наблюдается интересная закономерность. В частности, группы 1 и 2 демонстрируют сходство в обеднении микробного спектра, что может указывать на определенные патофизиологические механизмы, влияющие на репродуктивное здоровье.

В то же время группа 3 выделяется более широким разнообразием бактериальных таксонов, что частично свидетельствует о наличии более сложных взаимодействий между микробиотой и состоянием репродуктивной системы. Применение высокопроизводительных методов секвенирования ДНК следующего поколения (NGS) сыграло ключевую роль в переосмыслении традиционных представлений о стерильности мочевыводящих путей. Эти методы не только позволили детально охарактеризовать микробиом мочевыводящих путей, но и выявить наличие комменсальных микробных сообществ, которые ранее могли быть недооценены или вовсе не учитывались.

Следует отметить, что микробиота уретры мужчин подвержена значительной вариабельности и формируется на протяжении всей жизни под воздействием множества факторов внешней среды. Barbara van der Pol, David E. Nelson в своих работах описали широкий спектр уретральной микрофлоры, состоящей более чем из 70 родов, среди которых присутствуют как комменсальные, так и потенциально патогенные таксоны, которые могут негативно влиять на репродуктивный потенциал мужчины¹⁵³.

¹⁵³ Barbara van der Pol, David E. Nelson. Microbial Communities of the Male Urethra Published: 27 January 2016. doi: 10.1128/9781555819071.ch13.

Данная ситуация может быть объяснена нарушением целостности гематотестикулярного барьера (ГТБ) у пациентов третьей группы, страдающих от варикоцеле. ГТБ выполняет критически важную функцию в защите тестикулярной ткани от потенциально патогенных микроорганизмов и токсинов. При его нарушении происходит не только ослабление защитных механизмов, но и возможность проникновения микробов из окружающей среды и половых партнеров, что может способствовать развитию дисбиоза. Дисбиоз, в свою очередь, может вызывать воспалительные реакции, что подтверждается данными, представленными Mändar R и соавторами. В частности, *Streptococcus agalactiae* и *Gardnerella vaginalis*, традиционно ассоциированные с бактериальным вагинозом у женщин, способны инициировать воспалительные процессы в тканях яичка. Эти воспалительные реакции могут негативно влиять на качество спермы и репродуктивную функцию мужчин, что подчеркивает важность учета микробиоты полового партнера при оценке репродуктивного здоровья¹⁵⁴.

Данная гипотеза о взаимосвязи микробиоты уретры и infertility не является патогномоничной, поскольку микробиота уретры демонстрирует значительную вариабельность и нестабильность, что обусловлено анатомическими и физиологическими особенностями. В отличие от нее, микробиом яичка представляется более постоянным и структурированным.

При анализе микробиоты яичка в различных группах пациентов мы наблюдаем заметное снижение микробного разнообразия у лиц с идиопатической необструктивной азооспермией (НОА). Это свидетельствует о возможном нарушении микробного баланса, что может быть связано с патологическими процессами, затрагивающими репродуктивную функцию. В частности, особое внимание следует уделить семейству *Enterobacteriaceae*_A, которое не было обнаружено в нашей выборке пациентов с НОА и сопутствующим варикоцеле. Это отсутствие может указывать на специфические изменения в микробиоме яичка, которые могут влиять на сперматогенез и общую репродуктивную способность.

В недавнем систематическом обзоре, проведенном A. Brandao и соавторами, было проанализировано 749 источников, из которых в окончательный анализ вошли 9 статей, так как включались только оригинальные исследования на людях, в которых с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS) 16S рРНК характеризовался микробиом семенной жидкости фер-

¹⁵⁴ Reet Mändar. Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner Pharmacological Research Volume 69, Issue 1, March 2013, P. 32–41 doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.019.

тильных и/или здоровых мужчин (без явных признаков инфекции) для определения «нормального» или «здорового» семенного микробиома, что в результате позволило получить ценные данные о микробиоте семенной жидкости.

Обзор выявил, что наиболее распространенные бактерии в семенной микробиоте относятся к четырем основным типам: актинобактерии (*Corynebacterium* spp. и *Rhodococcus* spp.), Bacteroidetes (*Prevotella* spp.), Firmicutes (*Anaerococcus* spp., *Bacillus* spp., *Finegoldia* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Veillonella* spp.) и протеобактерии (*Burkholderia* spp., *Haemophilus* spp., *Proteus* spp. и *Pseudomonas* spp.). Эти результаты подтверждают существующие данные о разнообразии микробиоты в семенной жидкости и подчеркивают важность микробиома в контексте мужской фертильности¹⁵⁵.

Наше исследование, проводящее анализ тестикулярного микробиома инфертильных мужчин в России, выявило значительные различия в качественном составе микробиоты яичка у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией (НОА), обструктивной азооспермией (ОА) и варикоцеле.

В частности, результаты исследования показывают, что видовой состав микробиоты яичка у пациентов с НОА значительно отличается от такового у пациентов с варикоцеле. Это может свидетельствовать о том, что нарушения в микробиоме яичка могут быть связаны с патогенезом необструктивной азооспермии. Интересно, что микробиом тканей яичка у пациентов с ОА занимает промежуточное положение, демонстрируя наличие общих микроорганизмов как с группой НОА, так и с группой варикоцеле. Это может указывать на наличие смешанных патофизиологических механизмов, которые требуют дальнейшего изучения для более глубокого понимания взаимосвязи между микробиотой и репродуктивной функцией.

Таким образом, полученные результаты подчеркивают важность дальнейшего исследования микробиоты яичка и ее роли в мужском бесплодии. Сравнение с данными систематического обзора A. Brandao и соавторов демонстрирует необходимость интеграции знаний о микробиоме в клиническую практику для улучшения диагностики и лечения мужских репродуктивных нарушений.

На основании проведенного исследования можно заключить следующее. Микробиота уретры мужчин имеет широкий бактериальный спектр, который формируется на протяжении всей жизни, но имеет свои особенности у инфертильных мужчин за счет большего разнообразия бактериальных таксонов, фил

¹⁵⁵ Brandão A., Lavrador C., Fonseca B. M., Correia-da-Silva G., Teixeira N. (2023). The seminal microbiome in health and fertility: A systematic review. *Microorganisms*, 11(7), 1677.

и семейств. На наш взгляд, это связано с нарушением работы гематотестикулярной барьера (ГТБ), в частности у пациентов с варикоцеле, и требует дальнейших исследований. Структура микробиоты тестикулярной ткани демонстрирует снижение видового разнообразия у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией, с доминированием семейства *Enterobacteriaceae*_A. Это контрастирует с пациентами, страдающими обструктивной азооспермией, а также с пациентами с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. Сложившаяся ситуация и разночтения в научных публикациях и экспертных мнениях требуют дальнейшего расширения спектра междисциплинарных поисков и исследований. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что микробиота уретры может отражать не только состояние репродуктивной системы, но и общее состояние здоровья пациента. Это открывает новые горизонты для дальнейших исследований в данной области.

Проведение дополнительных исследований микробиоты яичка у инфертильных пациентов с различными формами азооспермии может привести к выявлению положительных результатов после варикоцелэктомии. Углубленное понимание этих взаимосвязей может способствовать разработке более эффективных методов диагностики и лечения мужского бесплодия.

Глава 13. Характеристика структуры тестикулярной микробиоты и уретры у мужчин с необструктивной азооспермией с различными исходами в протоколах ВРТ

Автор: Фаниев М. В.

13.1. Введение и актуальность

Причин мужского бесплодия много, или, как говорили древние, «имя им легион», но самой крайней формой является азооспермия.

Наименее изученной, а потому наиболее сложной и тяжело поддающейся лечению, является необструктивная азооспермия (НОА) — патологическое состояние, характеризующееся нарушением процесса созревания сперматозоидов или их полным отсутствием. НОА является наиболее серьезной причиной мужского бесплодия¹⁵⁶.

Для андролога не составляет труда на клиническом уровне отличить необструктивную азооспермию от обструктивной, внимательно изучив диагностические показатели (анамнез, результаты медицинского осмотра и анализ гормонального фона).

Вместе с тем при выборе тактики лечения врача подстерегает множество подводных камней, как, например, определение шансов успешной биопсии, подбор оптимального метода получения сперматозоидов и эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), для чего необходим грамотный алгоритм обследования для определения тактики и стратегии ведения пациентов.

Внедрение в широкую клиническую практику методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в частности экстракорпорального оплодотворения в сочетании с интрацитоплазматической инъекцией сперматозоида (ЭКО/ИКСИ), совершило революционный прорыв в лечении необструктивной азооспермии. Данный подход принципиально изменил прогноз для пациентов, предоставив им реальную возможность достижения биологического отцовства даже в случаях полного отсутствия сперматозоидов в эякуляте, благодаря использованию гамет, полученных хирургическим путем из яичка (TESE —

¹⁵⁶ Tharakan T., Luo R., Jayasena C. N., Minhas S. Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Fac Rev.* 2021 Jan 26; 10:7. doi: 10.12703/r/10-7. PMID: 33659925; PMCID: PMC7894261.

testicular sperm extraction) или его придатка (microTESE — микрохирургическая экстракция сперматозоидов из яичка).

Однако несмотря на этот значительный технологический прогресс, совокупная эффективность лечения остается ограниченной. По данным крупных метаанализов и национальных регистров, частота наступления беременности и рождения живого ребенка (live birth rate) на один цикл лечения у пар с мужским фактором НОА в среднем не превышает 20–30%¹⁵⁷.

До недавнего времени в андрологии доминировала парадигма, согласно которой этиология необструктивной азооспермии (НОА) исчерпывающе объяснялась первичными нарушениями сперматогенеза, обусловленными генетическими аномалиями (например, микроделециями Y-хромосомы или мутациями в генах сперматогенеза), эндокринными дисфункциями (гипогонадотропный гипогонадизм) и последствиями воспалительных заболеваний органов малого таза (орхит). Однако революционные достижения в области микробиомных исследований за последнее десятилетие кардинально изменили это представление. В настоящее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что микробиомные сообщества, в частности микробиота кишечника и урогенитального тракта, играют чрезвычайно важную роль в модуляции нормального функционирования репродуктивной системы, выступая в роли ключевого системного регулятора.

Так, кишечная микробиота участвует в метаболизме стероидных гормонов, синтезе ключевых витаминов и регуляции системного воспаления через ось «кишечник — печень — семенники». Дисбиоз кишечника может приводить к увеличению проницаемости кишечного барьера, эндотоксемии и провоспалительному статусу, что негативно влияет на гематотестикулярный барьер и подавляет сперматогенез.

В свою очередь, дисбиоз урогенитального тракта, характеризующийся снижением доли лактобацилл и колонизацией условно-патогенными видами (такими как *Fingoldia magna*, *Prevotella* spp., *Staphylococcus* spp.), способен поддерживать хроническое субклиническое воспаление в придаточных половых железах и самом семеннике, создавая локальное прооксидантное микроокружение, что приводит к оксидативному стрессу и повреждению герминативных клеток^{158, 159}.

¹⁵⁷ Попова А. Ю. и др. Варикоцеле и необструктивная азооспермия — с чего начать? // Андрология и генитальная хирургия. — 2017. — Т. 18. — №. 4. — С. 77–80.

¹⁵⁸ Mossadegh-Keller N., Sieweke M. H. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cell Immunol.* 2018 Aug; 330:120–125. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.03.009. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29650243.

¹⁵⁹ Sirota I., Zarek S. M., Segars J. H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med.* 2014 Jan; 32(1):35–42. doi: 10.1055/s-0033-1361821. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24390919; PMCID: PMC4137456.

Возникает закономерный вопрос: на основании чего проводится аналогия между микробиотой желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и мочеполовой системы? Данное сравнение является методологически оправданным и эвристически ценным по нескольким причинам.

Во-первых, гастроэнтерология действительно выступила пионером в области исследования микробиома человека. Благодаря масштабным инициативам, таким как Human Microbiome Project, именно в отношении микробиоты ЖКТ был накоплен колоссальный массив данных, наглядно демонстрирующих ее фундаментальную роль в поддержании системного гомеостаза: модуляции иммунного ответа, синтезе витаминов и метаболитов (короткоцепочечные жирные кислоты — КЦЖК), защите от патогенов и регуляции метаболических процессов. Эти принципы — колонизационная резистентность, симбиоз и дисбиоз — оказались универсальными для всех микробиомов человеческого тела¹⁶⁰.

Во-вторых, между этими системами существует прямая анатомическая и функциональная взаимосвязь. Мочеполовой тракт, его дистальные отделы, находится в тесной к желудочно-кишечному тракту, что создает возможности для транслокации микробов и их метаболитов. Более того, было установлено существование осей «кишечник — мочевого пузыря» и «кишечник — предстательная железа», через которые кишечная микробиота может дистанционно влиять на состояние уrogenитальных органов посредством иммунных и нейроэндокринных механизмов.

Таким образом, заимствование парадигмы и концептуальных моделей из гастроэнтерологии позволяет урологам и андрологам не начинать исследования с чистого листа, а использовать уже проверенные методические подходы и гипотезы для ускоренного понимания роли микробиоты в норме и при патологии мочеполовой системы.

Сегодня мы уже располагаем достоверными данными, что репродуктивную физиологическую дисфункцию, сопутствующие заболевания и неблагоприятные исходы беременности¹⁶¹, может вызвать дисбиоз микробиома репродуктивного тракта.

Это стало возможным благодаря современным лабораторным технологиям, в частности секвенированию нового поколения (NGS), расширившему технические возможности параметров исследования для проведения анализа

¹⁶⁰ Gilbert J. A., Blaser M. J., Caporaso J. G., Jansson J. K., Lynch S. V., Knight R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4), 392–400. doi: 10.1038/nm.4517

¹⁶¹ Schoenmakers S., Steegers-Theunissen R., Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet Med*. 2019 Sep; 12(3):107–115. doi: 10.1177/1753495X18775899. Epub 2018 May 17. PMID: 31523266; PMCID: PMC6734629.

сложных микробных сообществ в различных локусах человеческого организма, в том числе и репродуктивной системе¹⁶².

Именно секвенирование спермы установило, что она не стерильна и содержит специфическую флору, функции которой еще полностью не изучены. Одновременно следует отметить, что происхождение этих микроорганизмов неизвестно¹⁶³.

К сожалению, ограниченность наших знаний об этих микробных сообществах все еще остается одним из острых углов в изучении структуры микробиома тестикул.

Все еще до конца не изучен и продолжает оставаться *terra incognita* механизм формирования и поддержания бактериального спектра в репродуктивном тракте. Это отчасти объясняется тем, что исследований, способных пролить свет на роль микробиома в репродуктивных процессах и вообще в организме, проведено весьма ограниченное количество¹⁶⁴.

Обнаруженные при секвенировании 16S рРНК в сперме, моче и мазках из прямой кишки здоровых мужчин бактериальные сообщества и их сравнение, показало, что только 2,3% идентифицированных таксонов были общими для этих трех сред и 10% для спермы и мочи¹⁶⁵.

Внедрение в практику и расширение области применения полученных результатов привели к значительному увеличению объема знаний о различных биологических объектах. Вследствие проведенной работы пришло определенное понимание проблемы, позволившее изучить целые микробные колонии-поселения в образцах, оценить их взаимодействие и влияние на сперматозоиды^{166, 167}.

Сегодня в научной литературе можно найти большое количество работ о взаимосвязи структуры микробного сообщества урогенитального тракта и ин-

¹⁶² Almeida O. G. G., De Martinis E. C. P. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Jan; 103(1):69–82. doi: 10.1007/s00253-018-9464-9. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30362076.

¹⁶³ Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput.* 2020 Apr 13; 9(2):10. doi: 10.3390/ht9020010.

¹⁶⁴ Altmäe S., Franasiak J. M., Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology* volume 16, pages 703–721 (2019). doi: 10.1038/s41585-019-0250-y. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732723.

¹⁶⁵ Lundy S. D. et al. Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. *Eur Urol.* 2021 Jun; 79(6):826–836. doi: 10.1016/j.eururo.2021.01.014.

¹⁶⁶ Бородинов А. Г. и др. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) // Научное приборостроение. — 2020. — Т. 30. — №. 4. — С. 3–20.

¹⁶⁷ Janaina Aderaldo, Diego Teixeira, Mychelle Garcia Torres et al. A Shotgun Metagenomic Mining Approach of Human Semen Microbiome, 16 March 2022, Preprint (Version 1) available at Research Square. doi: 10.21203/rs.3.rs-1220437/v1.

фертильности. Но стоит отметить, что в сравнении с другими системами и органами, наше понимание микробиома тестикулярной ткани находится только в начале своего долгого и тернистого пути.

Повышение интереса к этой проблеме и проведение новых исследований с применением новейших технологий, позволит разработать принципиально новые биомаркеры мужского бесплодия, имеющие решающее значение для качественной диагностики и прогноза успешности преодоления этого заболевания¹⁶⁸.

13.2. Материалы и методы

Для более глубокого изучения проблемы мы приняли решение провести сравнительный анализ таксономической структуры микробиоты, содержащейся в тестикулах и уретре пациентов с необструктивной азооспермией, проходящих программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

В данном исследовании мы планировали рассмотреть две группы пациентов: первую, где были зарегистрированы успешные исходы в виде рождения детей, и вторую, которая не показала положительных результатов.

Этот сравнительный анализ позволит выявить возможные отличия в микробиологическом составе между двумя группами, что может иметь большое значение для оценки влияния микробиоты на репродуктивные способности мужчин.

Критериями отбора в группу исследуемых служили:

- добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании;
- возраст старше 18 лет;
- бесплодие в браке более 1 года при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции;
- подтвержденная необструктивная азооспермия;
- отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, гипоплазии;
- наличие онкологической патологии;
- отсутствие антибактериальной терапии в течение 3 месяцев и ИППП.

В свою очередь, критериями исключения являлись:

- онкологическая патология;
- ИППП;

¹⁶⁸ Garcia-Segura S., Del Rey J., Closa L., Garcia-Martínez I., Hobeich C., Castel A. B., Vidal F., Benet J., Ribas-Maynou J., Oliver-Bonet M. Seminal Microbiota of Idiopathic Infertile Patients and Its Relationship With Sperm DNA Integrity. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 28; 10:937157. doi: 10.3389/fcell.2022.937157. PMID: 35837328; PMCID: PMC9275566.

- генетические и эндокринные факторы бесплодия;
- тяжелая соматическая патология на момент обследования, требующая регулярного приема лекарственных средств, приводящих к развитию бесплодия и гипогонадизма;
- повышенная концентрация PSA в сыворотке крови более 4 нг/мл и/или повышение его свободной фракции более 5 нг/мл;
- психические заболевания, хронический алкоголизм, наркомания;
- ВИЧ-инфицированность.

В рамках исследования пациенты были разбиты на две группы, что позволило нам более детально проанализировать результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий. Первая группа включала 16 участников с необструктивной азооспермией, у которых был зафиксирован положительный результат ВРТ. Вторая группа состояла из 46 пациентов с теми же параметрами, но с отрицательным результатом.

Для оценки и реализации репродуктивного потенциала каждого участника были проведены процедуры microTESE в рамках протоколов ВРТ. Эта методика использовалась для извлечения сперматозоидов у инфертильных мужчин с необструктивной азооспермией, что в дальнейшем позволяло осуществить экстракорпоральное оплодотворение с использованием технологии ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида). Методика microTESE, была выбрана нами как наиболее эффективная для достижения заведомо лучших результатов в работе с пациентами, страдающими от данной формы мужского фактора бесплодия.

Кроме того, для глубинного анализа бактериального разнообразия в тестикулярной ткани, был выполнен анализ ампликонов бактериального гена 16S рРНК. Для этого использовалась технология высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS), которая позволяет получить детальную информацию о структуре микробиоты.

Данный подход имеет важное значение для понимания влияния бактериального сообщества на репродуктивное здоровье и эффективность вспомогательных репродуктивных технологий. Для выделения ДНК применялся колонный метод (ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, Promega USA), с предварительной обработкой лизоцимом. Разработанная нами методика запатентована специально для проведения проекта по изучению тестикулярного микробиома «Патент РФ № 2810.467 Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин 27.12.2023». У каждого, кому проводилась биопсия яичка, для контроля чистоты метода и изучения бактериального пейзажа урогенитального тракта, проводился забор биологического материала из уретры.

При обработке данных, как и в предыдущих исследованиях применялась программа QIIME (версия 1.9.1), обеспечивавшая в начале исследования надежные результаты на этапе предварительной обработки данных, с последующим переходом на QIIME2 с базой данных GreenGenes, которая позволила повысить точность таксономической классификации и глубину анализа микробиологического состава образцов.

13.3. Результаты

Анализ относительной представленности бактериальных таксонов паренхимы тестикулярной ткани больных с необструктивной формой азооспермии с положительными и отрицательными результатами ВРТ выявил ряд статистически значимых разнообразий (рис. 13.1).

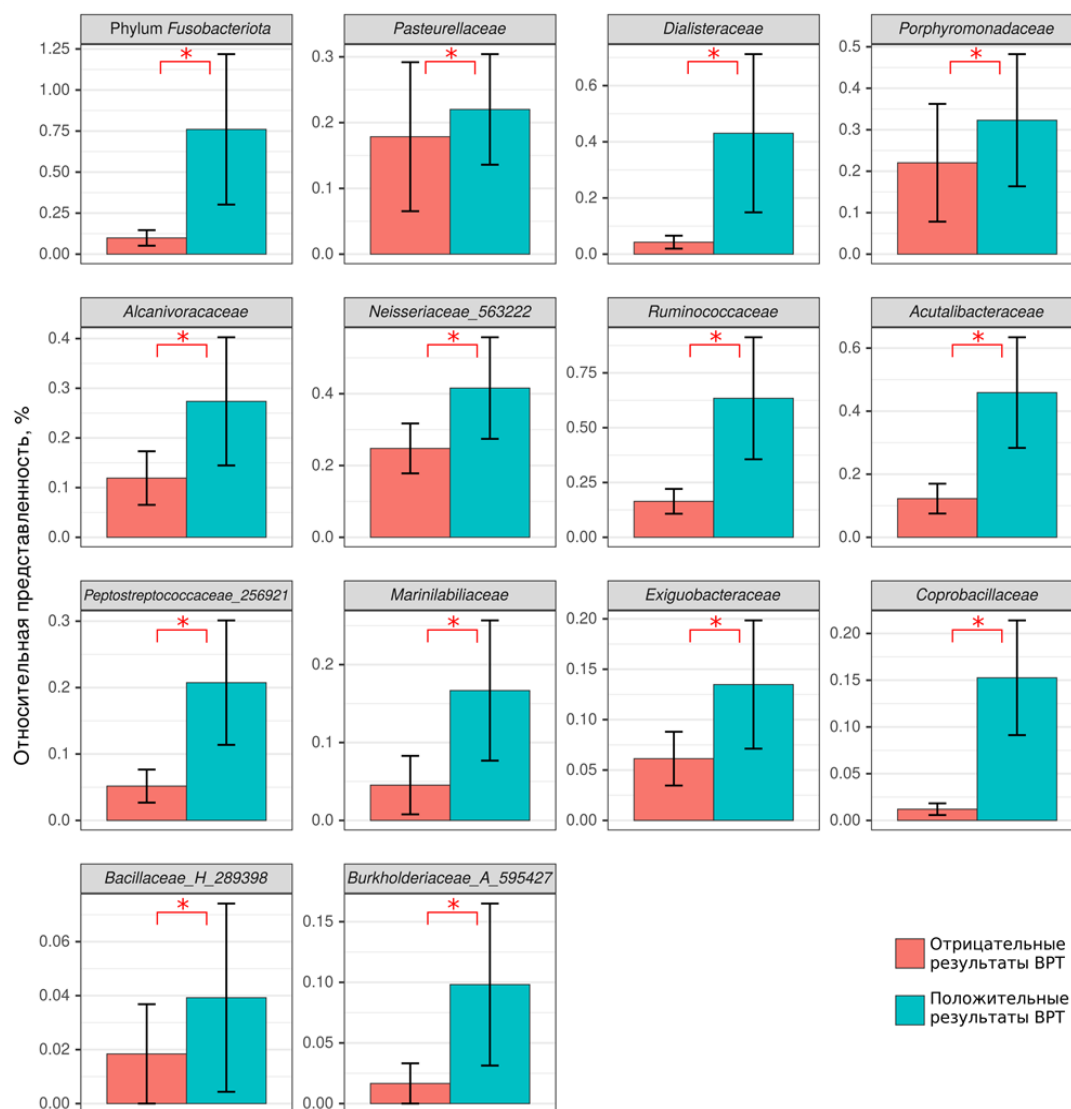


Рисунок 13.1. Достоверно отличающиеся бактериальные таксоны в микробиоте тестикулярной ткани у пациентов НОА с положительными и отрицательными результатами ВРТ.

Примечание: звездочкой отмечены статистически достоверные отличия ($p < 0,05$)

Исследование таксономического состава бактериальной микрофлоры тестикулярной ткани выявило значительные статистически достоверные различия ($p < 0,05$) в относительной представленности различных таксонов у пациентов с необструктивной азооспермией, которые достигли положительных результатов в процедурах вспомогательных репродуктивных технологий (группа 1). Особое внимание следует уделить следующим таксонам:

1. Filum Fusobacteriota: известны своей ролью в поддержании здоровья слизистой оболочки, могут участвовать в процессах воспаления, способны метаболизировать различные субстраты и влиять на местный иммунный ответ.

2. Семейство Pasteurellaceae: представители этого семейства могут указывать на наличие специфических патогенов, которые, в свою очередь, оказывают влияние на репродуктивную функцию. Эти бактерии также обладают иммуномодулирующими свойствами.

3. Семейство Dialisteraceae: способны участвовать в метаболических процессах и играть важную роль в создании стабильной микробиоты, что может быть полезно для поддержания репродуктивного здоровья.

4. Семейство Porphyromonadaceae: участвуют в разложении органических веществ и могут влиять на воспалительные процессы и микробиологическое равновесие в тканях.

5. Семейство Alcanivoracaceae: микроорганизмы этой семьи, как правило, связаны с разложением углеводов, и их появление может указывать на изменения в метаболических процессах.

6. Семейство Neisseriaceae_563222: могут участвовать в патогенезе различных заболеваний, но также могут быть частью нормальной микрофлоры, что следует учитывать при интерпретации их присутствия.

7. Семейство Ruminococcaceae: известно своими свойствами по перевариванию клетчатки и могут производить короткоцепочечные жирные кислоты, которые положительно влияют на репродуктивное здоровье.

8. Семейство Acutalibacteraceae: их роль в репродуктивной функции пока недостаточно изучена, однако, возможно, они могут участвовать во взаимодействиях с другими микроорганизмами.

9. Семейство Peptostreptococcaceae_256921: микроорганизмы участвуют в разложении белков и жиров, что актуально для поддержания общего здоровья тканей.

10. Семейство Marinilabiliaceae: характеристики и роль в репродуктивной системе человека требуют дальнейшего изучения, однако они могут быть связаны с регуляцией микробной активности.

11. Семейство Exiuobacteraceae: благоприятно влияют на здоровье, так как могут участвовать в детоксикации и поддержании нормального обмена веществ.

12. Семейство Coprobacillaceae: присутствие может указывать на специфику имеющегося микробного сообщества и его влияние на общую функциональность.

13. Семейство Bacillaceae_H_289398: бактерии этого семейства могут быть связаны с защитой от патогенов, что может способствовать улучшению репродуктивных результатов.

14. Семейство Burkholderiaceae_A_595427: Несмотря на то что некоторые представители этого семейства могут быть патогенными, они также могут участвовать в метаболических процессах (табл. 13.1).

Таблица 13.1. Достоверно отличающиеся по частоте встречаемости бактериальные семейства в микробиоте ткани яичка

Семейство	Отрицательный результат ВРТ		Положительный результат ВРТ		Точный критерий Фишера
	Обнаружено (кол-во образцов (%))	Не обнаружено (кол-во образцов (%))	Обнаружено (кол-во образцов (%))	Не обнаружено (кол-во образцов (%))	
фила Fusobacteriota	11 (23,9%)	35 (76,1%)	9 (56,3%)	7 (43,8%)	0,029
Lactobacillaceae	25 (54,3%)	21 (45,7%)	14 (87,5%)	2 (12,5%)	0,033
Pasteurellaceae	9 (19,6%)	37 (80,4%)	9 (56,3%)	7 (43,8%)	0,009
Alcanivoracaceae	5 (10,9%)	41 (89,1%)	6 (37,5%)	10 (62,5%)	0,026
Acutalibacteraceae	12 (26,1%)	34 (73,9%)	13 (81,3%)	3 (18,8%)	0,0002
Peptostreptococcaceae_256921	7 (15,2%)	39 (84,8%)	7 (43,8%)	9 (56,3%)	0,034
Exiguobacteraceae	7 (15,2%)	39 (84,8%)	7 (43,8%)	9 (56,3%)	0,034
Coprobacillaceae	6 (13,0%)	40 (87,0%)	7 (43,8%)	9 (56,3%)	0,028
Bacillaceae_H_289398	1 (2,2%)	45 (97,8%)	3 (18,8%)	13 (81,3%)	0,049
Burkholderiaceae_A_595427	1 (2,2%)	45 (97,8%)	3 (18,8%)	13 (81,3%)	0,049

Исследование микробиома уретры не выявило достоверных различий в индексах альфа-разнообразия, даже при использовании высокопроизводительного секвенирования. Вместе с тем у пациентов с положительными результатами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) было зафиксировано значительное ($p < 0,05$) увеличение относительной представленности следующих таксонов: фила Actinobacteriota, а также семейств Enterococcaceae и Brevibacteriaceae. Подробно рассмотрим каждый из этих компонентов:

1. Filum Actinobacteriota: характеризуются высокими метаболическими возможностями и разнообразием. Actinobacteria являются известными производителями природных антибиотиков и других биоактивных соединений.

Они также играют важную роль в поддержании микробного равновесия и могут способствовать защите от патогенных микроорганизмов. Увеличение их представленности может означать наличие здоровой микробиоты у мужчин с положительными результатами ВРТ, что может быть связано с повышением репродуктивной функции.

2. Семейство Enterococcaceae: Бактерии этого семейства, включая род *Enterococcus*, широко представлены в человеческом организме, особенно в кишечнике и мочеполовой системе. Некоторые представители этого семейства могут обладать пробиотическими свойствами, способствуя поддержанию баланса микрофлоры. Увеличение относительной численности Enterococcaceae у пациентов с положительными результатами ВРТ может свидетельствовать об их роли в поддержании здоровья мочеполовой системы и повышения фертильности.

3. Семейство Brevibacteriaceae: представители, как правило, ассоциированы с кожей и слизистыми оболочками. Участвуют в процессах метаболизма и играют роли в поддержании микробиологического равновесия. Увеличение их представленности у пациентов с положительными исходами ВРТ может указывать на их потенциальную полезность в контексте репродуктивного здоровья, поскольку они могут улучшать условия для полноценной работы мочеполовой системы (рис. 13.2).

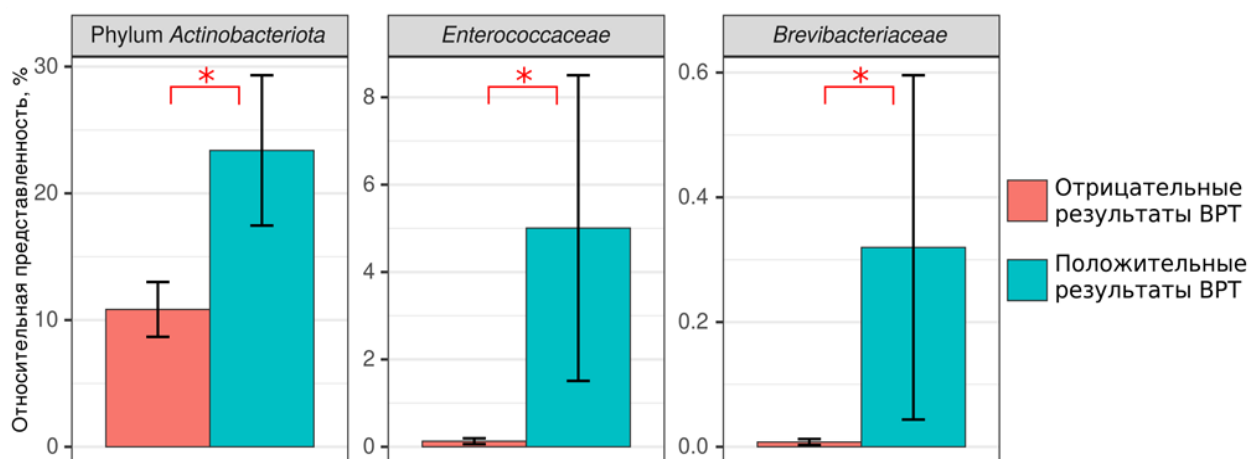


Рисунок 13.2. Достоверно отличающиеся бактериальные семейства в микробиоте уретры у пациентов НОА с положительными и отрицательными результатами ВРТ.

Примечание: звездочкой отмечены статистически достоверные отличия ($p < 0,05$)

В процессе нашего исследования были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) в частоте встречаемости бактериального семейства Streptococcaceae. Интересно, что эти микроорганизмы значительно чаще встречались у пациентов с отрицательными результатами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Напротив, у пациентов с благоприятным

исходом программ ВРТ, было отмечено повышенное присутствие представителей семейства Enterococcaceae.

Семейство Streptococcaceae включает в себя разнообразные виды стрептококков, некоторые из которых являются патогенными и могут вызывать воспалительные процессы в организме. В контексте репродуктивного здоровья повышенная частота представительства стрептококков может указывать на наличие воспалительных заболеваний мочеполовой системы, таких как уретрит или простатит, что, вероятно, снижает шансы на успешное зачатие.

С другой стороны, представительство семейства Enterococcaceae указывает на наличие пробиотических (защитных) бактерий, таких как Enterococcus faecalis, которые могут оказывать положительное влияние на здоровье. Эти микроорганизмы способствуют поддержанию микробного равновесия, выделяют антимикробные вещества и могут предотвратить рост патогенных бактерий, тем самым создавая более благоприятные условия для репродуктивной деятельности (табл. 13.2).

Таблица 13.2. Достоверно отличающиеся по частоте встречаемости бактериальные семейства в микробиоте уретры

Семейство	Отрицательный результат ВРТ		Положительный результат ВРТ		Точный критерий Фишера
	Обнаружено (кол-во образцов (%))	Не обнаружено (кол-во образцов (%))	Обнаружено (кол-во образцов (%))	Не обнаружено (кол-во образцов (%))	
Streptococcaceae	31 (67,4%)	15 (32,6%)	5 (31,3%)	11 (68,7%)	0,018
Enterococcaceae	5 (10,9%)	41 (89,1%)	8 (50%)	8 (50%)	0,002

13.4. Обсуждение и выводы

Результаты наших недавних исследований микробиома подтвердили, содержание значительного количества микроорганизмов в тестикулярной ткани, что подчеркивает важность учета микробных сообществ, находящихся в нижележащих отделах урогенитального тракта. Понимание видового состава микробиоты тестикул имеет решающее значение для изучения этиологии и патогенеза инфекций урогенитального тракта и их влияния на репродуктивные функции. Несмотря на то что только 9% человеческой микробиоты обнаруживается в урогенитальном тракте, современная техника высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) позволила нам более детально оценить таксономическую структуру микробного сообщества, выявив отличия в относительной представленности и частоте встречаемости бактерий в различных группах пациентов, не обнаружив при этом существенных различий в индексах альфа-разнообразия.

Одним из интересных аспектов нашего исследования стало обнаружение колонизации тестикулярной ткани представителями филы *Fusobacteriota*, которая включает грамотрицательные анаэробные бациллы. Эти микроорганизмы традиционно ассоциируются с ротовой полостью и желудочно-кишечным трактом, но их присутствие в тестикулах может иметь важные клинические последствия. В частности, *Fusobacteriota* известна своей способностью к метаболизму, участвуют в процессах разложения органических веществ и могут влиять на развитие воспалительных процессов.

Обогащение ДНК *Fusobacteriota* было также обнаружено в метастатических абсцессах почек и в тканях колоректального рака, что указывает на их потенциальную роль в опухолевом прогрессировании. Исследования показали, что *Fusobacterium nucleatum*, как один из ключевых представителей этой группы, может играть важную роль в иницировании и поддержании воспалительных процессов, а также способствовать миграции опухолевых клеток и инвазии. Не исключено, что это связано с механизмами, которые позволяют этим микроорганизмам избегать иммунного ответа и создавать адекватные условия для распространения инфекции или злокачественного процесса¹⁶⁹.

Наличие *Fusobacteriota* в тестикулярной ткани и их преобладание в образцах пациентов с положительными результатами ВРТ может указывать на их важную клиническую значимость, включая как потенциальные защитные, так и патологические свойства. Это подчеркивает необходимость дальнейшего изучения взаимосвязей между микробиотой и состоянием здоровья, а также их возможное стимулирующее или угнетающее воздействие на репродуктивные функции.

В ходе нашего исследования были выявлены 13 доминирующих семейств бактерий, относящихся к филам *Firmicutes*, *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Замечено, что большинство из этих микроорганизмов проявляют комфортное существование в организме пациентов с положительными результатами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Это открытие подчеркивает важность микробиоты в репродуктивном здоровье и стимулирует интерес к пониманию роли бактерий в процессе фертильности. Среди выявленных семейств следует выделить:

— *Dialisteraceae* — некоторые из них могут участвовать в метаболических процессах, расщепляя сложные углеводы и производя короткоцепочечные жирные кислоты, которые играют важную роль в поддержании здоровья слизистых оболочек и могут иметь противовоспалительные свойства.

¹⁶⁹ Brennan C. A., Garrett W. S. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Mar; 17(3):156–166. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6. PMID: 30546113; PMCID: PMC6589823.

— Porphyromonadaceae — являются анаэробными и в основном обитают в кишечнике. Они участвуют в расщеплении растительной клетчатки и производят жирные кислоты с короткой цепью, которые полезны для здоровья. Известно, что некоторые представители этого семейства могут быть связаны с воспалительными процессами и требует более глубокого изучения. Фил *Peptostreptococcaceae*_256921 включает также в себя анаэробные грамположительные бактерии, характерные для нормальной микробиоты ротовой полости и кишечника. Некоторые из них могут выполнять симбиотические функции, участвовать в метаболических процессах, а также оказывать влияние на иммунный ответ организма и семейство *Acetivibacteraceae*, подобно предыдущим, тесно связаны с кишечной микрофлорой и могут участвовать в метаболических взаимодействиях, которые положительно влияют на общее состояние здоровья.

С другой стороны, семейство *Burkholderiaceae* включает в себя грамотрицательные бактерии, некоторые из которых — патогены. Они ассоциированы с различными легочными инфекциями, включая хроническую гранулематозную болезнь и муковисцидоз. *Burkholderia pneumoniae*, например, может вызывать тяжелые пневмонии и серьезные инфекции у пациентов с иммунодефицитом, а также у людей с предрасположенностью к легочным заболеваниям.

Выявление патогенных таксонов, таких как *Burkholderia*, может указывать на возможные инфекционные риски у пациентов с дисбалансом микробиоты, особенно если это сочетается с другими факторами, такими как воспаление или инфекция. Поскольку микробиота играет важную роль в поддержании здоровья, любое изменение в ее составе может привести к негативным последствиям, включая ухудшение репродуктивной функции¹⁷⁰.

Может возникнуть некая научная коллизия, вызванная тем, что по выявленным микроорганизмам наши данные не соотносятся с результатами ряда исследований. В частности, Alfano M. и соавторы (2018) и др. утверждают, что ткани яичка с нормальным сперматогенезом охарактеризованы преобладанием *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria* как доминирующих типов, а у мужчин с азооспермией были обнаружены только *Actinobacteria* и *Firmicutes*, но эти отличия могут быть следствием различий в экологии, культуре, образе жизни, кулинарных традициях, и возможных вредных факторов, которые присущи каждой отдельной популяции в определенной локации. Изучение этих различий, может стать темой для интересного и полезного исследования.

¹⁷⁰ Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R., Roller C. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. J Clin Microbiol. 1998 Sep; 36(9):2748-51. doi: 10.1128/JCM.36.9.2748-2751.1998. PMID: 9705429; PMCID: PMC105199.

В ходе проведенного исследования микробиома ткани яичка была выявлена статистически значимая разница в характере колонизации бактериями семейства *Lactobacillaceae* между группами с различными исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В группе пациентов с успешным наступлением беременности (клиническая беременность по данным УЗИ) представители рода *Lactobacillus* были детектированы в 87,5% образцов. Напротив, в группе с неудачными попытками ЭКО/ИКСИ частота выявления лактобацилл составила лишь 54,3% ($p < 0,05$). Полученные данные позволяют предположить, что наличие определенных штаммов *Lactobacillus* в микробиоте тестикулярной ткани может ассоциироваться с более благоприятными условиями для сперматогенеза и, как следствие, с повышенной эффективностью ВРТ. Это может быть обусловлено их способностью модулировать локальный иммунный ответ, подавлять активность провоспалительных цитокинов и снижать уровень оксидативного стресса в ткани яичка, что важно для созревания и сохранения целостности ДНК сперматозоидов.

Выявленная корреляция согласуется с результатами исследований микробиоты эякулята, в которых более высокая относительная представленность *Lactobacillus* также ассоциировалась с лучшими качественными показателями спермограммы и повышала вероятность успешного исхода программ ВРТ¹⁷¹.

Lactobacillus — род пробиотических бактерий, играющих важную роль в поддержании микробиологического равновесия как у женщин, так и у мужчин. У женщин данный вид бактерии, преобладая в вагинальной микрофлоре, создает необходимую кислую среду, способствующую защите от патогенных микроорганизмов. Они производят молочную кислоту, что не только подавляет рост вредных бактерий, но и способствует нормализации pH, для поддержания здоровья и фертильности. Кроме того, наличие *Lactobacillus* связывают с улучшением параметров естественной беременности¹⁷² и результативности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), поскольку их присутствие указывает на здоровую микробиоту.

Исследования показывают, что и у мужчин *Lactobacillus* также имеют потенциальное значение, оказывая влияние на качество спермы (подвижность, морфологию и концентрацию сперматозоидов). Также большую роль играют

¹⁷¹ Koedooder R. et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. Hum Reprod. 2019 Jun 4; 34(6):1042–1054. doi: 10.1093/humrep/dez065.

¹⁷² Baqui A. H. et al. Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh // Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. 2019. T. 98. № 3. С. 309–319. Acta Obstet Gynecol Scand. 2019 Mar; 98(3):309–319. doi: 10.1111/aogs.13492. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30346023; PMCID: PMC6389396.

пробиотические свойства *Lactobacillus*, такие как способность к выработке антимикробных веществ и модуляции иммунного ответа. В контексте репродуктивного здоровья *Lactobacillus* может рассматриваться как важный фактор для поддержания здоровой экосистемы в урогенитальном тракте, что благоприятно сказывается на фертильности мужчин.

Следует обратить внимание и на то, что многие из таксонов, обнаруженных в повышенной концентрации в тестикулярной ткани пациентов с необструктивной азооспермией, относятся к грамотрицательным бактериям, которые содержат в своих клеточных стенках липополисахариды. Липополисахариды (ЛПС) — это молекулы, являющиеся частью внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Они известны своей ролью в активации иммунного ответа и воспалительных процессов. Когда ЛПС попадают в организм, они могут взаимодействовать с клетками иммунной системы и активировать каскады сигнализации, что приводит к выделению различных цитокинов. Цитокины же, регулируя воспалительные и иммунные реакции, могут индуцировать воспаление, негативно влияющее на репродуктивные функции¹⁷³.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что влияние медиаторов воспаления на фрагментацию ДНК в сперматозоидах представляет собой значительный механизм, ограничивающий репродуктивные способности мужчин. Эффективный контроль над воспалительными процессами может помочь в улучшении качества спермы и достижении успешных репродуктивных исходов. Следует отметить, что фрагментация ДНК в сперматозоидах — процесс, при котором происходит разрыв цепей ДНК, что может ухудшать качество спермы и ее способности к оплодотворению. Исследования показывают, что воспалительные медиаторы, например, цитокины и воспалительные белки, могут воздействовать на сперматозоиды, что приводит к повреждению их ДНК. Механизм этого воздействия складывается следующими регламентированными событиями:

1. Воспаление и его медиаторы.

При воспалении в организме выделяются различные медиаторы, такие как интерлейкины и факторы некроза опухолей. Эти молекулы могут оказывать токсическое воздействие на клетки, включая сперматозоиды. Они могут вызывать окислительный стресс, который приводит к образованию свободных радикалов.

¹⁷³ Candelli M., Franza L., Pignataro G., Ojetti V., Covino M., Piccioni A., Gasbarrini A., Franceschi F. Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 10; 22(12):6242. doi: 10.3390/ijms22126242. PMID: 34200555; PMCID: PMC8226948.

2. Окислительный стресс.

Свободные радикалы повреждают клеточные компоненты, в том числе ДНК. Поскольку сперматозоиды имеют ограниченные возможности для репарации своей ДНК, повреждения, вызванные окислительным стрессом, могут проявиться во фрагментации ДНК.

3. Фрагментация ДНК и репродуктивные способности.

Фрагментация ДНК в сперматозоидах связано с различными проблемами, такими как снижение подвижности сперматозоидов, их способности к оплодотворению и успешному развитию эмбрионов. Это может привести к бесплодию или повышенному риску выкидышей и генетическим нарушениям у потомства^{174, 175}.

Сравнительный анализ микробиоты уретры показал, что альфа-диверситет образцов из уретры значительно ниже, чем в тестикулярной ткани. Параллельно наблюдалось значительное увеличение относительной представленности таких фил, как Actinobacteriota, а также семейств Enterococcaceae и Brevibacteriaceae у пациентов с положительными результатами ВРТ.

Кроме того, следует отметить, что существует множество актуальных исследований, посвященных влиянию бактериальных сообществ на их экологические ниши, что связано с их метаболической активностью. Эти работы подчеркивают важность микробиома в различных биологических процессах и его потенциальное воздействие на здоровье человека. Микробиота, образующаяся в определенных локусах, может оказывать влияние на локальную физиологию и иммунный ответ, что, в свою очередь, может быть связано с клиническими исходами, такими как успешность оплодотворения и развитие избранного эмбриона. Исследование метаболической активности бактерий и их взаимодействия с человеческим организмом становится все более важным для понимания их роли в репродуктивном здоровье¹⁷⁶.

В качестве примера можно провести аналогию с поддержанием кислой среды в постоянном режиме у женщин во влагалище, что играет критическую

¹⁷⁴ Tvrdá E., Lovíšek D., Gálová E., Schwarzková M., Kováčiková E., Kunová S., Žiarovská J., Kačániová M. Possible Implications of Bacteriospermia on the Sperm Quality, Oxidative Characteristics, and Seminal Cytokine Network in Normozoospermic Men. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 4; 23(15):8678. doi: 10.3390/ijms23158678. PMID: 35955814; PMCID: PMC9369207.

¹⁷⁵ Rojas C., Gálvez-Jirón F., De Solminihaç J., Padilla C., Cárcamo I., Villalón N., Kurte M., Pino-Lagos K. Crosstalk between Body Microbiota and the Regulation of Immunity. *J Immunol Res.* 2022 May 19; 2022:6274265. doi: 10.1155/2022/6274265. PMID: 35647199; PMCID: PMC9135571.

¹⁷⁶ Visconti A., Le Roy C. I., Rosa F., Rossi N., Martin T. C., Mohnhey R. P., Li W., de Rinaldis E., Bell J. T., Venter J. C., Nelson K. E., Spector T. D., Falchi M. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nat Commun.* 2019 Oct 3; 10(1):4505. doi: 10.1038/s41467-019-12476-z. PMID: 31582752; PMCID: PMC6776654.

роль в обеспечении здоровья, защищая их от инфекций и способствуя поддержанию нормальной микрофлоры. Кислая среда влагалища (pH 3,8–4,5) представляет собой ключевой компонент физиологической защиты репродуктивного тракта. Основным механизмом поддержания низкого pH обеспечивается метаболической активностью доминирующих представителей аутохтонной микробиоты — лактобацилл (*Lactobacillus* spp.), которые продуцируют молочную кислоту в процессе ферментации гликогена, содержащегося в вагинальном эпителии.

Данный кислотный барьер выполняет функцию ингибирования роста оппортунистических и патогенных микроорганизмов. Низкий pH подавляет адгезию, пролиферацию и вирулентность широкого спектра возбудителей, включая *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* и другие уропатогены, тем самым предотвращая развитие бактериального вагиноза, вульвовагинального кандидоза и восходящих инфекций.

Вагинальный микробиом находится под строгим гормональным контролем. Эстрогены стимулируют пролиферацию вагинального эпителия и накопление гликогена — субстрата для лактобацилл. Физиологические (менструация, беременность) или патологические (гипоэстрогения, антибиотикотерапия) изменения гормонального фона могут приводить к снижению численности лактобацилл и сдвигу pH в щелочную сторону, что создает условия для дисбиоза и колонизации патогенами.

В периоды гормональных изменений (пубертат, беременность, менопауза) наблюдаются значительные колебания вагинального pH. Например, в постменопаузе дефицит эстрогенов ассоциирован с уменьшением пула лактобацилл и повышением pH > 5.0, что коррелирует с повышенной восприимчивостью к инфекциям мочеполового тракта. Таким образом, поддержание кислой среды влагалища является фактором локального иммунитета и микробного гомеостаза, а его нарушения служат ключевым патогенетическим звеном в развитии различных гинекологических заболеваний¹⁷⁷.

Данные, доступные в текущей научной литературе, свидетельствуют о том, что здоровый микробиом уретры характеризуется уникальным микробным пейзажем, который подвержен изменениям и не является статичным. Эти изменения могут быть обусловлены множеством экзогенных факторов, включая воздействие окружающей среды, изменения в образе жизни, диету, гормональный статус, а также использование медикаментозных средств. Тем не ме-

¹⁷⁷ O'Hanlon D. E., Come R. A., Moench T. R. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. BMC Microbiol. 2019 Jan 14; 19(1):13. doi: 10.1186/s12866-019-1388-8. PMID: 30642259; PMCID: PMC6332693.

нее многие исследования, посвященные анализу микробиоты уретры, демонстрируют ограниченное таксономическое разнообразие, что может указывать на недостаточные знания о полноте микробного состава и его функциональных особенностях¹⁷⁸.

Факт значительной вариабельности численности бактерий является одним из ключевых аспектов характеристики микробиоты. В частности, в тестикулярной ткани наблюдается существенно более высокое разнообразие бактериальных семейств по сравнению с уретрой. Это различие подчеркивает важность микробного состава для здоровья репродуктивной системы, поскольку сдвиги в микробиоте могут предшествовать развитию дисбиоза, что, в свою очередь, приводит к значительным макроскопическим изменениям показателей спермы, негативно сказываясь на фертильности.

Дополнительно следует учитывать, что у генетически предрасположенных особей дисбаланс взаимодействия между микробиотой и иммунной системой может стать катализатором патогенеза различных иммуноопосредованных расстройств. В определенных условиях окружающей среды этот дисбаланс может нарушить гомеостаз и создать предрасположенность к репродуктивным потерям.

¹⁷⁸ Toh E., Xing Y., Gao X., Jordan S. J., Batteiger T. A., Batteiger B. E., Van Der Pol B., Muzny C. A., Gebregziabher N., Williams J. A., Fortenberry L. J., Fortenberry J. D., Dong Q., Nelson D. E. Sexual behavior shapes male genitourinary microbiome composition. *Cell Rep Med.* 2023 Mar 21; 4(3):100981. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.100981. PMID: 36948151; PMCID: PMC10040456.

Глава 14. Взаимодействие между микробиомом и мастоцитами тестикулярной ткани при мужской infertility

Авторы: Фаниев М. В., Кульченко Н. Г., Воложанский Д. И.

14.1. Введение и актуальность

Репродуктивная функция представляет собой сложную мультифакторную систему, основанную на динамическом взаимодействии нейроэндокринной регуляции, иммунного надзора и микробного гомеостаза. Ключевым элементом этой системы является тестикулярный иммунитет, характеризующийся феноменом иммунной привилегии. Данный механизм обеспечивает толерантность иммунной системы к аутоантигенам развивающихся половых клеток, которые экспрессируют множество уникальных протеинов, отсутствующих в постпубертатный период на других клетках организма.

Гистологически иммунная привилегия яичка поддерживается комплексом механизмов:

- гематотестикулярный барьер, образованный плотными контактами между клетками Сертоли, который ограничивает проникновение иммунокомпетентных клеток в адлюминальное пространство семенных канальцев;
- активная иммуносупрессорная активность клеток Сертоли, экспрессирующих FasL и продуцирующих противовоспалительные цитокины (TGF- β , IL-10);
- наличие регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) и резидентных макрофагов M2-фенотипа, создающих иммуносупрессивное микроокружение;
- локальная продукция андрогенов, обладающих иммуномодулирующими свойствами.

Нарушение целостности гематотестикулярного барьера (при воспалении, травме, инфекции) может приводить к контакту иммунной системы с антигенами сперматогенеза и развитию аутоиммунного орхита, что является одной из причин мужского бесплодия. Современные исследования также демонстрируют роль тестикулярной микробиоты в поддержании локального иммунного гомеостаза через механизмы молекулярной мимикрии и регуляции цитокинового профиля¹⁷⁹.

¹⁷⁹ Santacroce L., Imbimbo C., Ballini A., Crocetto F., Scacco S., Cantore S., Di Zazzo E., Colella M., Jirillo E. Testicular Immunity and Its Connection with the Microbiota. Physiological

Тестикулярный иммунитет представляет собой уникальную и сложную специфику иммунного ответа, необходимую для защиты чувствительных репродуктивных структур от повреждений и инфекций, а также для поддержания нормального репродуктивного процесса. Он характеризуется двумя основными аспектами: иммунной привилегией и сложной сетью взаимодействий между различными клеточными и молекулярными компонентами.

Иммунная привилегия тестикул обусловлена необходимостью защиты сперматозоидов, которые содержат белки, отличные от собственного организма, и могут вызывать аутоиммунные реакции. Для предотвращения таких реакций в тестикулярной ткани развиваются специальные механизмы. Например, она содержит защитные молекулы, такие как белки, способствующие иммуномодуляции, а также элементы, которые способствуют образованию барьеров для защиты от активных компонентов иммунной системы. Тестикулярные клетки, включая сперматозоиды и клетки Лейдинга, взаимодействуют с макрофагами, тучными клетками, лимфоцитами и другими типами клеток, создавая сложную сеть, способствующую как врожденному, так и адаптивному иммунному ответу. Мастоциты, в частности, являются важным компонентом, поскольку они не только участвуют в модуляции сосудистой проницаемости и воспалительных процессов, но также помогают контролировать местные иммунные ответы, балансируя между защитными и повреждающими эффектами.

Врожденный иммунный ответ в тестикулярной ткани включает в себя активное участие фагоцитов, таких как макрофаги, которые захватывают и уничтожают патогенные микроорганизмы. Также важную роль играют антимикробные пептиды и цитокины, обеспечивающие быструю реакцию на угрозы, и способствуют активации адаптивного иммунитета. Адаптивный иммунный ответ тестикул также имеет свои особенности. Например, Т-лимфоциты в яичках могут улаживать важные иммунные процессы, активируя другие клетки для борьбы с инфекциями или адаптируя иммунный ответ. Это позволяет тестикулярной ткани защищаться от определенных патогенов, сохраняя при этом репродуктивные функции.

Не менее важно, что нарушения в тестикулярном иммунитете могут привести к различным патологиям, включая воспалительные заболевания, аутоиммунные расстройства и, как следствие, к бесплодию. Таким образом, понимание механизмов тестикулярного иммунитета не только углубляет наши знания о репродуктивном здоровье мужчин, но и открывает новые возможности

для разработки терапевтических подходов к лечению связанной с ним патологии^{180, 181}.

Тучные клетки, или мастоциты, играют важную роль в иммунной системе и являются ключевыми элементами, находящимися в различных тканях, включая яички. Эти клетки обладают уникальной способностью к выделению различных медиаторов, мостящихся в гидрофобной части их цитоплазмы, что делает их важными игроками в иммунном ответе, воспалительных реакциях и восстановлении тканей.

Мастоциты содержат большое количество гранул, заполненных различными медиаторами, такими как гистамин, цитокины, хемоаттрактанты и разные ферменты. При активации мастоциты выделяют эти вещества, что может вызвать широкую реакцию, такую как увеличение проницаемости сосудов, расширение капилляров и привлечение других иммунных клеток к месту воспаления. В яичках мастоциты выполняют несколько ключевых функций:

— помогают поддерживать иммунную привилегию тестикул, предотвращая аутоиммунные реакции против сперматозоидов и других белков, экранирующихся на поверхности этих клеток;

— участвуют в модуляции воспалительных процессов, что важно для обеспечения сбалансированного иммунного ответа. Активированные мастоциты способны выделять сигнальные молекулы, которые регулируют поведение других иммунных клеток, таких как лимфоциты и макрофаги.

Исследования показывают, что мастоциты могут оказывать влияние на процесс сперматогенеза. Считается, что их медиаторы способствуют созреванию и транспорту сперматозоидов. В то время как мастоциты играют ключевую роль в поддержании нормального функционирования тестикул, их дисфункция или аномальное увеличение могут привести к различным патологическим состояниям.

Например, повышенное количество мастоцитов может ассоциироваться с воспалительными или аллергическими заболеваниями, а также с бесплодием у мужчин¹⁸². Они играют важную роль в обеспечении иммунной привилегии и поддержании гомеостаза яичек¹⁸³, воздействуя на проницаемость сосудов и

¹⁸⁰ Gu X., Li S. Y., DeFalco T. Immune and vascular contributions to organogenesis of the testis and ovary. *FEBS J.* 2022 May; 289(9):2386–2408. doi: 10.1111/febs.15848.

¹⁸¹ Ibishev K. S., Mamedov E. A., Magomedov H. A. The immunological aspects of male infertility: 2016–2020 literature review. *Urology Herald.* 2020; 8(3):97–102. doi: 10.21886/2308-6424-2020-8-3-97-102.

¹⁸² Kulchenko N. G. Mast cell hyperactivity as the factor in the pathogenesis of male infertility. *Research and Practical Medicine Journal.* 2022; 9(1):117–124. doi: 10.17709/2410-1893-2022-9-1-10.

¹⁸³ Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014 Sep; 11(5):428–37. doi: 10.1038/cmi.2014.38.

модулируя иммунный ответ. Более того, мастоциты участвуют в процессе сперматогенеза, что подчеркивает их значимость для репродуктивного здоровья¹⁸⁴.

Мастоциты участвуют в патогенезе различных клинических патологий, и их роль в неконтролируемых воспалительных реакциях становится предметом активных исследований¹⁸⁵.

Приведем несколько примеров заболеваний, где мастоциты играют ключевую роль.

Мастоциты были выявлены в атеросклеротических бляшках и принимали участие в развитии этого заболевания. Они способствуют воспалению и нестабильности бляшек за счет высвобождения медиаторов, таких как гистамин и провоспалительные цитокины. Медиаторы, в свою очередь, могут активировать другие иммунные клетки, такие как макрофаги, которые накапливаются в бляшках и способствуют их разрастанию. Это создает риск тромбообразования, который может привести к инфаркту миокарда и инсульту, где в условиях ишемии, возникающей при инфаркте миокарда, мастоциты активируются и выделяют ряд химических веществ, включая факторы роста и провоспалительные медиаторы. Эти вещества могут способствовать рекрутированию дополнительных иммунных клеток, активирующих воспалительные реакции, что, в свою очередь, может усугубить повреждение сердечной ткани¹⁸⁶.

Мастоциты участвуют в поддержании аутоиммунного ответа, в частности, при таких заболеваниях, как волчанка и ревматоидный артрит. Они могут способствовать воспалению и повреждению тканей, за счет активации Т-лимфоцитов и высвобождению аутоантител, что ведет к прогрессированию болезни. В патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, таких как болезнь Крона и язвенный колит, мастоциты также играют важную роль. Их активное участие в ответ на микробиоту и околокишечные воспаления может способствовать поддержанию хронического воспаления и повреждения слизистой оболочки кишечника. Также тучные клетки вовлечены в процессы ремоделирования тканей при легочном и печеночном фиброзе. Они могут выделять факторы, активирующие фибробласты, что приводит к избыточному образованию

¹⁸⁴ Elieh Ali Komi D., Shafaghat F., Haidl G. Significance of mast cells in spermatogenesis, implantation, pregnancy, and abortion: Cross talk and molecular mechanisms. *Am J Reprod Immunol.* 2020 May; 83(5):e13228. doi: 10.1111/aji.13228.

¹⁸⁵ Soboleva M., Nikityuk D., Alexeeva N., Klochkova S., Atyakshin D., Gerasimova O., Sokolov D., Kvaratskheliya A. Features of histotopography of skin mast cells when simulating a burn under conditions of using various methods of regional exposure. *Genes & Cells.* 2021; 16(1):69–74. doi: 10.23868/202104011.

¹⁸⁶ Varricchi G., de Paulis A., Marone G., Galli S. J. Future Needs in Mast Cell Biology. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 6; 20(18):4397. doi: 10.3390/ijms20184397.

соединительной ткани и фиброзу. Обсуждается также их участие в аутоиммунных расстройствах, таких как эндометриоз, болезнь Крона и воспалительные заболевания кишечника, а также в процессах легочного и печеночного фиброза^{187, 188}.

В то время как специфические молекулярные пути регуляции активации и дегрануляции мастоцитов (тучных клеток) в контексте тестикулярных патологий остаются недостаточно изученными, накапливающиеся данные позволяют предположить их значимую роль в патогенезе нарушений сперматогенеза. Гистопатологические исследования тканей яичек пациентов с идиопатическим бесплодием, а также с такими состояниями, как варикоцеле и обструктивная азооспермия, демонстрируют значительное увеличение плотности интерстициальных мастоцитов по сравнению с фертильными контролями.

Патогенетическое влияние активированных мастоцитов на сперматогенез может осуществляться через несколько механизмов:

— Прямое цитотоксическое действие: дегрануляция мастоцитов приводит к массивному выбросу преформированных медиаторов, таких как триптаза, химаза и гистамин, которые могут непосредственно нарушать целостность гематотестикулярного барьера, индуцировать апоптоз клеток Сертоли и герминативных клеток.

— Индукция фиброза: высвобождение профибротических факторов (например, TGF- β 1, FGF-2) стимулирует пролиферацию фибробластов и избыточное отложение внеклеточного матрикса в интерстиции, что нарушает архитектуру извитых семенных канальцев и ухудшает их кровоснабжение.

— Модуляция иммунного ответа: мастоциты выступают ключевыми инициаторами и регуляторами хронического воспаления, рекрутируя в ткань яичка другие иммунные клетки (макрофаги, лимфоциты) через хемотаксис и активацию эндотелия, тем самым усугубляя иммунно-опосредованное повреждение паренхимы.

— Влияние на сосудистую проницаемость и кровоток: гистамин и другие вазоактивные амины повышают проницаемость микрососудов, способствуя развитию отека и нарушению локальной гемодинамики, что критически важно для поддержания адекватной температуры яичек и трофики сперматогенного эпителия.

Таким образом, мастоцитоз в интерстиции яичка можно рассматривать не как следствие, а как потенциальный драйвер патологического процесса, который

¹⁸⁷ Kutukova N. A., Nazarov P. G. Mast cells: a role in inflammation, tissue repair and fibrosis. *Citokiny i vospalenie*. 2014; 13(2):11–20.

¹⁸⁸ Da Silva E. Z., Jamur M. C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*. 2014 Oct; 62(10):698-738. doi: 10.1369/0022155414545334.

через механизмы хронического воспаления, фиброза и оксидативного стресса и приводит к нарушению сперматогенной функции¹⁸⁹, что в конечном итоге может быть причиной мужского бесплодия¹⁹⁰.

Изучение таксономической структуры микробиоты тестикулярной ткани в последние годы становится одной из наиболее актуальных и динамичных областей биомедицинских исследований. Методы NGS обеспечивают высокопроизводительное и экономически эффективное секвенирование большого количества ДНК, что позволяет получать детализированные данные о микробных сообществах, присутствующих в различных органах и тканях, включая тестикулярную ткань.

Эта технология существенно увеличила наши возможности в исследовании сложных микробиомов, поскольку она позволяет идентифицировать не только известные микроорганизмы, но также и ранее неизвестные виды, благодаря своей высокой чувствительности и специфичности.

Секвенирование позволяет не только количественно оценивать разнообразие микробов, но и изучать их взаимодействия, метаболические способности и функциональные роли. На основе полученных данных исследователи могут выяснять, какие микробы доминируют в определенной ткани и как они влияют на физиологические и патофизиологические процессы. Например, в контексте тестикул можно проанализировать, как изменения в микробиоте могут повлиять на иммунный ответ, сперматогенез и общую репродуктивную функцию¹⁹¹.

14.2. Материалы и методы

В данном исследовании было проанализировано состояние тестикулярной ткани у инфертильных пациентов с диагнозом азооспермия, с целью более глубокого понимания патогенеза данного состояния и его взаимосвязи с различными формами бесплодия. В выборку вошли 33 пациента, которые в течение периода с 2018 по 2021 год проходили обследование по поводу бесплодия. Средний возраст участников составил $39,4 \pm 10,7$ лет (от 23 до 74 лет). Средняя продолжительность бесплодного брака составила 7,8 лет, что указывает на

¹⁸⁹ Schmid N., Stöckl J. B., Flenkenthaler F., Dietrich K. G., Schwarzer J. U., Köhn F. M., Drummer C., Fröhlich T., Arnold G. J., Behr R., Mayerhofer A. Characterization of a non-human primate model for the study of testicular peritubular cells-comparison with human testicular peritubular cells. *Mol Hum Reprod.* 2018 Aug 1; 24(8):401–410. doi: 10.1093/molehr/gay025.

¹⁹⁰ Abdel-Hamid A. A. M., Atef H., Zalata K. R., Abdel-Latif A. Correlation between testicular mast cell count and spermatogenic epithelium in non-obstructive azoospermia. *Int. J. Exp. Pathol.* 2018 Feb; 99(1):22–28. doi: 10.1111/iep.12261.

¹⁹¹ Allen-Vercoe E. Bringing the gut microbiota into focus through microbial culture: recent progress and future perspective. *Current opinion in microbiology.* 2013 Oct; 16(5):625-9. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.008. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24148301; PMCID: PMC3859468.

значительный срок, в течение которого пациенты сталкивались с проблемой зачатия.

В каждом случае проводилось тестирование на предмет общего соматического состояния и основной патологии, после чего выполнялась процедура тестикулярной экстракции сперматозоидов (TESE) для забора биоптатов. Пациенты были разделены на две группы по типу азооспермии: первая группа включала 21 пациента с необструктивной азооспермией (НОА), вторая группа состояла из 12 пациентов с обструктивной азооспермией (ОА).

Полученные образцы тестикулярной ткани были отправлены на рутинное патогистологическое исследование (ПГИ), что давало возможность оценить морфологические изменения и структурные параметры, связанные с состоянием сперматогенеза. Гистологический анализ произведен с акцентом на оценку степени нарушения сперматогенеза, выполненную по шкале D. De Kretser и A. Holstein. Эта шкала позволяет классифицировать степень и характер нарушений сперматогенеза, что важно для диагностики различных видов азооспермии.

При гистологическом исследовании особое внимание уделено оценке состояния семенных канальцев, поскольку нарушения в их структуре могут служить показателями нарушений сперматогенеза. Анализируя семенные канальцы, выявляли степень зрелости сперматозоидов, а также наличие или отсутствие клеток Сертоли и Лейдига, ответственных за поддержание и развитие сперматогенеза.

Кроме того, важно было оценить состояние межканальцевой структуры паренхимы яичка, которая содержит интерстициальные клетки и матрикс, играющие важную роль в поддержании гомеостаза тестикул. Изменения в межканальцевой ткани могут говорить о воспалении, фиброзе или других патологиях, которые могут повлиять на гормональное воздействие и, следовательно, на репродуктивную функцию (патент на изобретения RU 2 814 377 C1, от 29.06.2023 «Способ определения необходимости выполнения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов при идиопатическом мужском бесплодии с необструктивной азооспермией»).

В исследовании оценивалось состояние микроциркуляторного русла, а также соотношение клеток Лейдига, фибробластов, макрофагов и мастоцитов в биоптатах тестикулярной ткани пациентов с азооспермией. Это очень важно, поскольку микроциркуляторное русло играет ключевую роль в обеспечении тканей необходимыми питательными веществами, кислородом и факторами роста, а также в выведении метаболитических отходов. Нормальное функционирование микроциркуляции важно для поддержания гомеостаза в тканях, включая тестикулы, которые имеют высокий уровень метаболической активности.

Состояние микроциркуляторного русла анализировалось с использованием гистологических методов, которые включали изучение структуры и целостности капилляров, артериол и венул. Патологические изменения, такие как утолщение стенок сосудов, нарастание фиброза или ишемия, могут указывать на нарушения в микроциркуляции, что, в свою очередь, может негативно влиять на сперматогенез и общую функцию яичек.

Кроме того, важно было исследовать соотношение различных клеточных типов:

— Клетки Лейдига: расположены в интерстиции яичек, вырабатывают тестостерон, необходимый для поддержания сперматогенеза. Изменения в количестве и функциональном состоянии клеток Лейдига могут служить индикаторами гормонального дисбаланса, влияющего на фертильность.

— Фибробласты: участвуют в образовании и поддержании внеклеточного матрикса, что важно для структуры тестикул. Изменения в числе фибробластов могут указывать на процессы фиброза или регенерации.

— Макрофаги: играют важную роль в иммунном ответе и могут участвовать в удалении поврежденных клеток, а также регулировании воспалительных процессов. Их количество и активность могут быть важными маркерами состояния воспаления в тестах.

— Мастоциты: как уже обсуждалось ранее, эти клетки также вносят вклад в иммунную регуляцию и могут быть вовлечены в поддержание местного гомеостаза. Их присутствие может указывать на воспалительные реакции в тестикулярной ткани.

Для определения экспрессии маркеров мастоцитов использовали иммуногистохимическую окраску с анти-МСТ (Anti-Mast Cell Tryptase). Триптаза является специфическим маркером мастоцитов и ее количество при цитолендоскопии может дать важную информацию о состоянии этих клеток. Иммуногистохимическая реакция позволяет визуализировать мастоциты в тканевых срезах, что важно для оценки их плотности и распределения в тестикулярной ткани. Проведенный анализ включал 3 основных этапа:

1. Приготовление срезов: ткани фиксируются, обрабатываются и нарезаются на тонкие срезы для последующего анализа.

2. Иммуноокрашивание: срезы обрабатываются антителами к триптазе, что позволяет специфически выявить мастоциты.

3. Визуализация и анализ: после окраски с применением соответствующего реагента, клетки визуализируются под микроскопом, где можно оценить их количество, морфологию и распределение.

Для оценки регуляции процесса сперматогенеза и функциональной активности эндокринологического статуса всем пациентам определяли концентрацию

общего тестостерона, ингибина В, фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ).

Как и в предыдущих наших исследованиях для определения структуры микробиоты тестикулярной ткани был проведен анализ ампликонов бактериального гена 16S рРНК с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) «Патент РФ № 2810.467 Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин 27.12.2023».

Всем пациентам, кому проводилась тестикулярная биопсия, был произведен забор биологического материала из уретры с целью исследования бактериального пейзажа урогенитального тракта и контроля чистоты метода. Данные обрабатывались, как и ранее с помощью программы QIIME (версия 1.9.1).

Статистическую обработку полученных данных выполняли в программной среде R (R-project, 2020, <https://www.r-project.org/>). Корреляционный анализ был проведен с использованием коэффициента Спирмена. Значение $p < 0,05$ было принято как статистически достоверное.

Целью работы являлось исследование взаимосвязи между количеством и активностью мастоцитов в тестикулярной ткани инфертильных пациентов с азооспермией и состоянием сперматогенеза, а также выявление патогенных механизмов, влияющих на развитие бесплодия, путем анализа состояния микроциркуляторного русла, соотношения клеток Лейдига, фибробластов, макрофагов и мастоцитов в биоптатах. Данное исследование направлено на углубление понимания клеточных и молекулярных процессов, связанных с бесплодием у мужчин, а также на выявление потенциальных целей для разработки новых методов диагностики и терапии.

14.3. Результаты

В ходе данного исследования мы провели анализ таксономической структуры микробиоты тестикулярной ткани и уретры у пациентов с обструктивной (ОА) и необструктивной (НОА) азооспермией. Мы также оценили взаимосвязь между численностью мастоцитов и составом микробиоты. Результаты показали значительное отличие микробиоты пациентов с необструктивной азооспермией от микробиоты пациентов с обструктивной азооспермией ($p < 0,05$). В частности, в первой группе мы отметили более высокую частоту обнаружения бактерий из семейств Enterobacteriaceae и Xanthomonadaceae, а также родов Finegoldia, Bifidobacterium, Porphiromonas, Prevotella, Peptoniphilus и Pseudomonas (рис. 14.1).

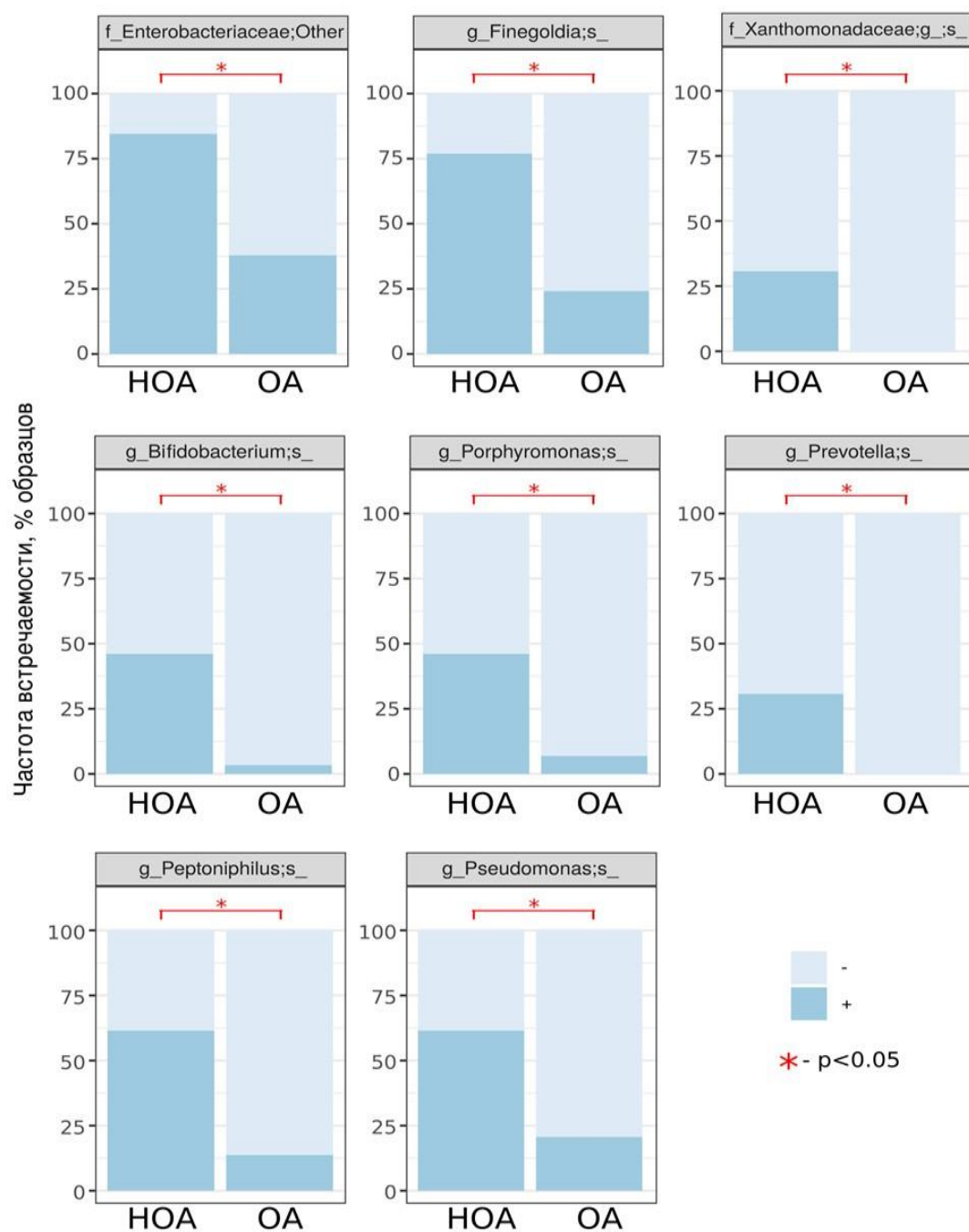


Рисунок 14.1. Частота встречаемости бактериальных таксонов, обнаруженных в образцах ткани яичка и уретры.

Примечание: звездочкой отмечены статистически достоверные отличия ($p < 0,05$)

Из изученной литературы известно, что *Lactobacillus*, *Pseudomonas* и *Prevotella* являются основными бактериальными компонентами семенной жидкости. Стоит отметить, что увеличение численности рода *Prevotella* связано со снижением уровня *Lactobacillus*, а это может оказать негативное влияние на репродуктивную функцию. В частности, обилие *Prevotella* обратно коррелирует с концентрацией сперматозоидов в образцах, что свидетельствует о его потенциально негативной роли в сперматогенезе. Более того, было установлено, что высокая концентрация *Pseudomonas* имеет прямую зависимость

от общего количества подвижных сперматозоидов, что указывает на важность этого рода в контексте фертильности¹⁹².

Анализ уровня гормонов у пациентов группы 1 выявил снижение концентрации тестостерона и повышение уровней фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего гормонов (ЛГ). Кроме того, была зафиксирована обратная корреляционная связь между уровнем ингибина В и концентрациями ФСГ и ЛГ в тестикулярной ткани и уретре пациентов данной группы ($r = -0,678$, $p < 0,05$ и $r = -0,645$, $p < 0,05$ соответственно). Стоит отметить, что наблюдается также обратная корреляция между уровнями ФСГ и ЛГ у пациентов с нормозооспермией (НОА) и количеством обнаруженных операционных таксономических единиц (ОТЕ) в уретре, где корреляционный коэффициент составил $r = -0,485$ ($p < 0,05$) (рис. 14.2).

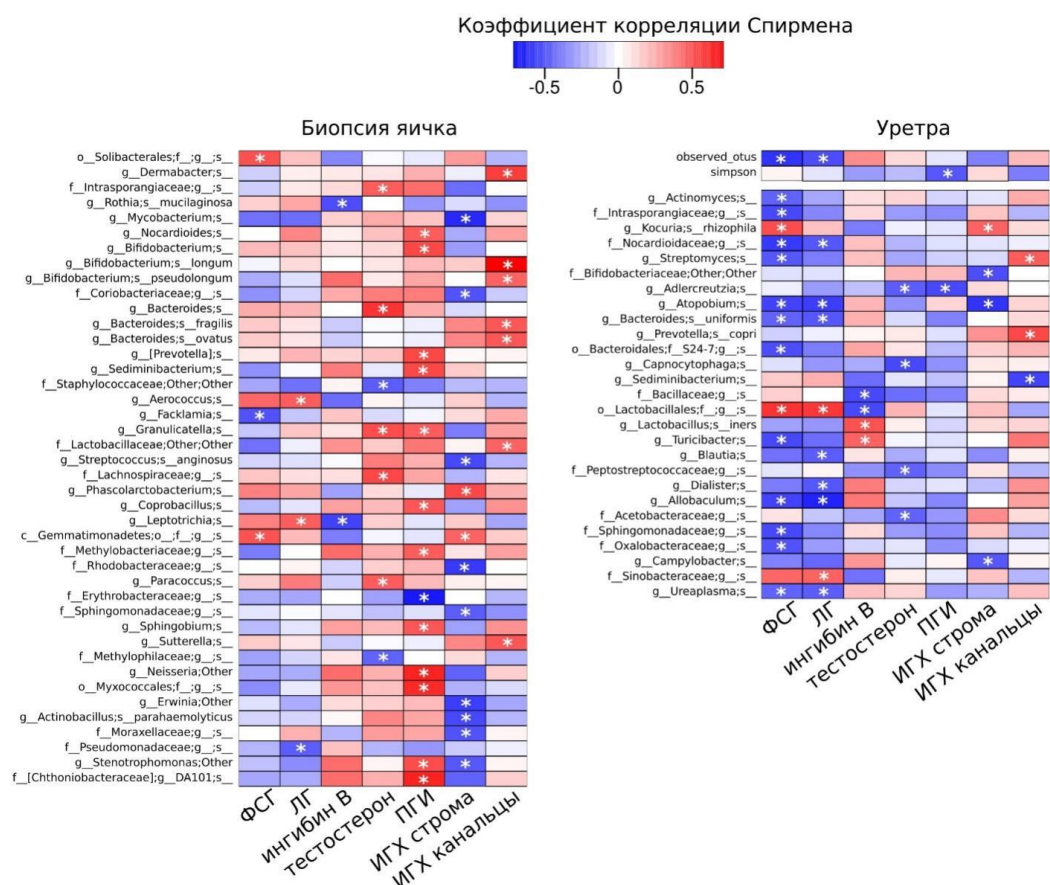


Рисунок 14.2. Корреляции показателей лабораторных исследований с микробиотой у пациентов с необструктивной азооспермией.

Примечание: звездочкой отмечены статистически достоверные корреляции, красная ячейка — корреляция положительная, синяя — отрицательная. Чем интенсивнее цвет, тем сильнее корреляция

¹⁹² Lundy S. D., Sangwan N., Parekh N. V., Selvam M. K. P., Gupta S., McCaffrey P., Besso K., Vala A., Agarwal A., Sabanegh E. S., Vij S. C., Eng C. Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. Eur Urol. 2021 Jun; 79(6):826–836. doi: 10.1016/j.eururo.2021.01.014.

В группе 2 была отмечена более частая встречаемость представителей семейства Enterobacteriaceae, а также родов Finegoldia, Peptoniphilus и Pseudomonas (рис. 14.1).

У пациентов, страдающих обструктивной азооспермией (ОА), наблюдалась низкая встречаемость рода Prevotella, что может указывать на специфические особенности микробиоты, ассоциированные с данным состоянием. Кроме того, анализ показал, что общее количество обнаруженных операционных таксономических единиц (ОТЕ) в группе 2 значительно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов, имеющих необструктивную азооспермию. Полученные данные могут свидетельствовать о различной структуре и разнообразии микробиома в этих двух группах, что потенциально имеет клиническое значение.

Данные результаты подчеркивают важность изучения микробных сообществ и их роли в патогенезе бесплодия, а также могут служить основой для дальнейших исследований в этой области (рис. 14.3).

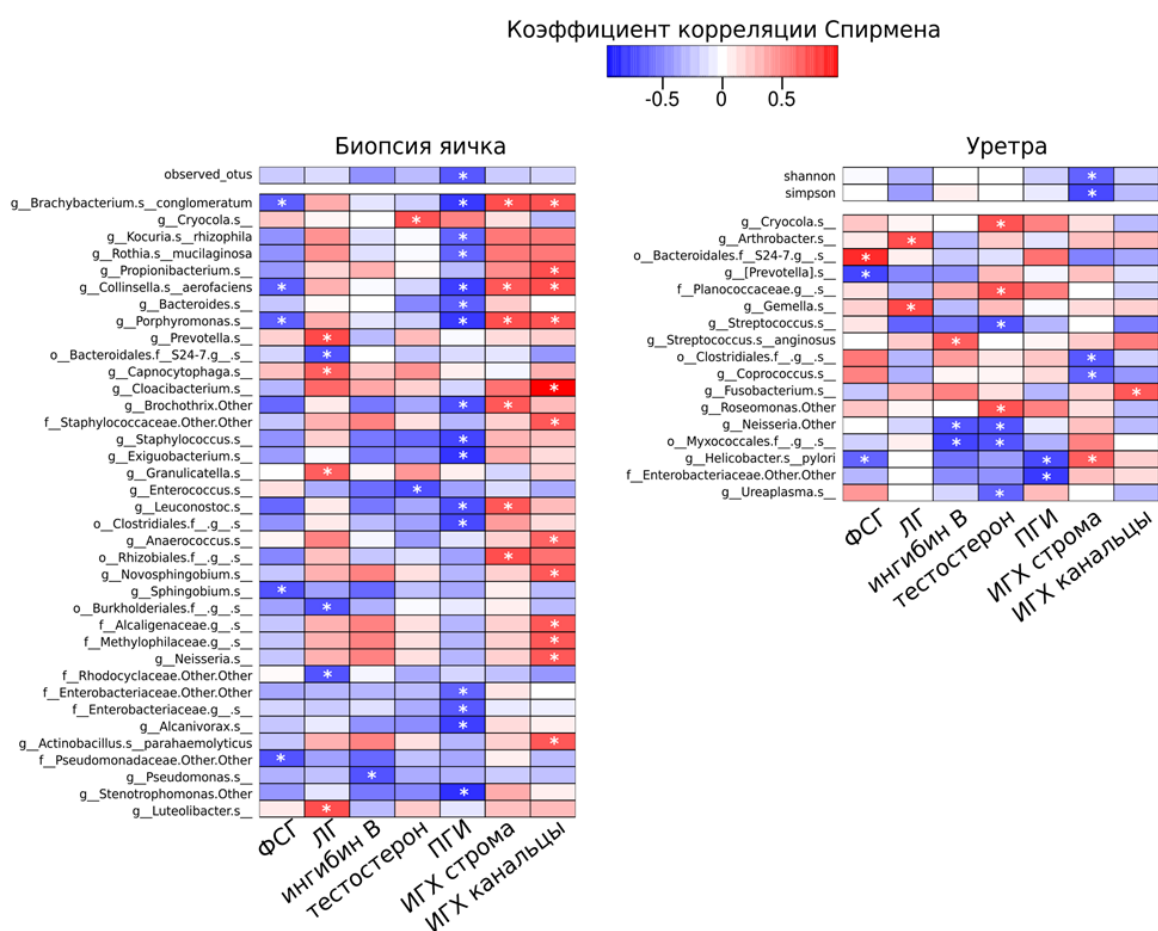


Рисунок 14.3. Корреляции показателей лабораторных исследований с микробиотой у пациентов с обструктивной азооспермией.

Примечание: звездочкой отмечены статистически достоверные корреляции, красная ячейка — корреляция положительная, синяя — отрицательная.

Чем интенсивнее цвет, тем сильнее корреляция

В ходе проведенного исследования выявлено, что таксономическое разнообразие микробиоты уретры было достоверно ниже, чем в ткани яичек, что наблюдалось в обеих исследуемых группах. Статистический анализ продемонстрировал наличие значимой отрицательной корреляции между альфа-разнообразием микробиома тестикулярной ткани и плотностью мастоцитов в строме у пациентов с обструктивной азооспермией (ОА). Сила корреляции составила $r = -0,591$ ($p < 0,05$) для индекса Шеннона и $r = -0,680$ ($p < 0,05$) для индекса Симпсона, что указывает на взаимосвязь между уменьшением микробного разнообразия и увеличением количества тучных клеток в интерстиции.

При проведении гистологического анализа тестикулярной ткани особое внимание было уделено комплексной оценке как состояния семенных канальцев (диаметр, толщина базальной мембраны, полноценность сперматогенеза), так и характеристикам межканальцевой стромы. Детальному изучению подверглись особенности микроциркуляторного русла (плотность капилляров, состояние эндотелия), а также количественное и качественное соотношение клеточных популяций, включая клетки Лейдига, фибробласты, макрофаги и мастоциты. Такой комплексный подход позволил выявить тонкие структурные изменения паренхимы яичка, ассоциированные с различными формами азооспермии.

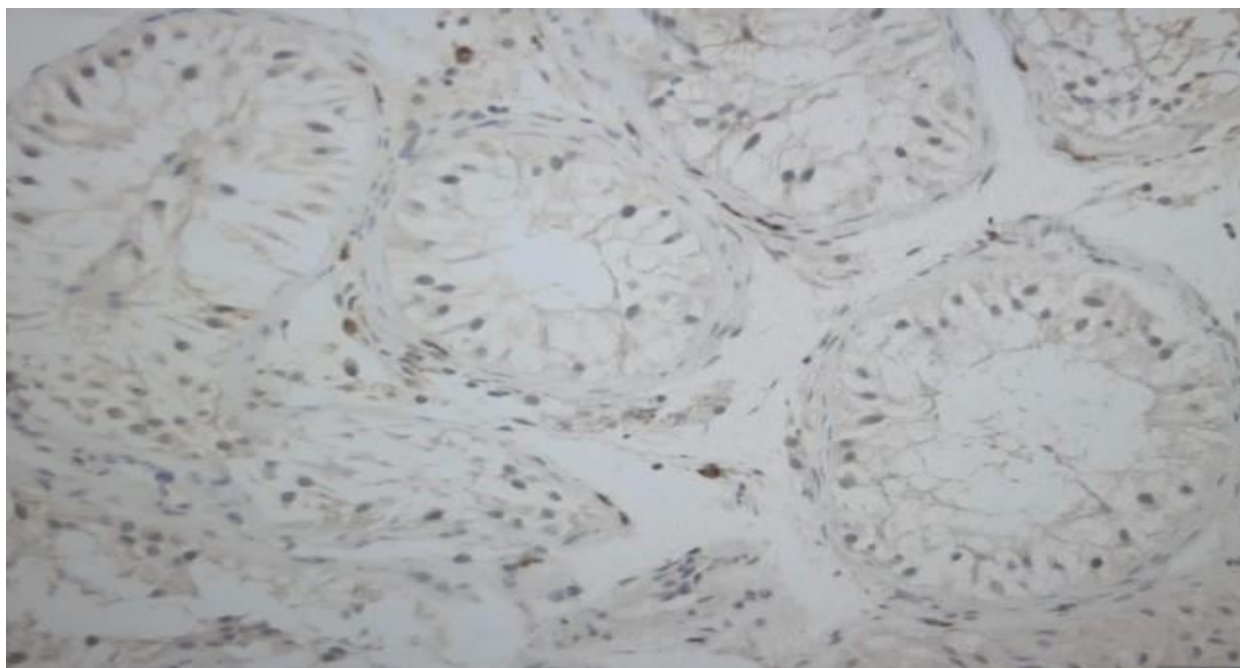


Рисунок 14.4. Ткань яичка пациента с азооспермией. Иммуногистохимическая окраска с анти-МСТ. Мастоциты видны как клетки, окрашенные коричневым цветом, содержащие гранулы в цитоплазме

Наблюдения показали утолщение интимы и склероз наружной оболочки венозных и артериальных сосудов, что указывает на наличие артериосклероза,

потенциально способствующего ухудшению микроциркуляции и кислородного обеспечения тканей яичка. Также были выявлены повреждения и дегенерация клеток Лейдига, что коррелирует с нарушениями сперматогенеза. Дегенерация этих клеток может играть важную роль в возникновении бесплодия, поскольку они ответственны за продукцию тестостерона, необходимого для нормального процесса сперматогенеза.

Гистопатологический анализ выявил положительную иммуногистохимическую реакцию на триптазу мастоцитов (анти-МСТ), что проявлялось окрашиванием, создающим характерный гранулированный цитоплазматический узор на фоне тучных клеток, некоторые из которых демонстрировали признаки дегрануляции. Это свидетельствует о вовлеченности тучных клеток в воспалительные процессы, происходящие в яичках, и может указывать на нарушения в регуляции иммунного ответа в данной ткани.

В ходе проведения патоморфологического гистологического исследования (ПГИ) у пациентов с азооспермией, обладающих низким разнообразием микробного пейзажа, было зафиксировано значительное количество мастоцитов, присутствовавших в межканальцевой строме в 83% случаев.

Мастоциты также были обнаружены в канальцевых структурах яичек у 68% пациентов, при этом наблюдается значительная корреляция между их количеством и составом микробиоты. В частности, в группе пациентов с НОА была выявлена высокая положительная корреляционная связь с такими микроорганизмами, как *Bifidobacterium* (коэффициент корреляции $r = 0,710$, $p < 0,05$) и *Derma bacter* (коэффициент корреляции $r = 0,527$, $p < 0,05$). Эти виды бактерий известны своими пробиотическими свойствами и могут положительно влиять на состояние здоровья, способствуя нормализации функций сперматогенеза и улучшению качества спермы.

В противоположность этому, в группе пациентов с обструктивной азооспермией (ОА) была отмечена положительная корреляция с другими микробными видами: *Cloacibacterium* ($r = 0,961$, $p < 0,05$), *Propionibacterium* ($r = 0,665$, $p < 0,05$), *Collinsella* ($r = 0,665$, $p < 0,05$), *Porphyromonas* ($r = 0,647$, $p < 0,05$) и семейство *Staphylococcaceae* ($r = 0,632$, $p < 0,05$). Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что микробиота у пациентов с ОА отличается от таковой у пациентов с НОА, что может отражать различные патогенетические механизмы, связанные с воспалением и дисфункцией яичек.

Интересно, что полное отсутствие мастоцитов наблюдалось только у 32% пациентов, что может указывать на варьирующее состояние иммунного ответа и его влияние на патологию сперматогенеза. Это открытие поднимает важные вопросы о роли мастоцитов в контексте микробного пейзажа и их потенциальной связи с репродуктивной функцией.

14.4. Обсуждение и выводы

Локальное увеличение количества тучных клеток в сочетании с нарушениями микробного сообщества может играть ключевую роль в развитии необратимых изменений в тестикулярной ткани, что, возможно, в свою очередь, связано с бесплодием у мужчин. Эти изменения могут быть результатом комплексного взаимодействия между иммунной системой, микробиотой и патогенными микроорганизмами, что создает порочный круг бесконечных нарушений репродуктивной функции.

С учетом изложенного, можно представить механизм развития мужского бесплодия как порочный круг инфертильности. Важным аспектом этого процесса является то, что несмотря на мощный иммунный арсенал мужских половых желез и наличие собственной микроэкологии, яички могут подвергаться атаке патогенов, попадающих из уретры, а также патогенной флоры, передающейся половым путем¹⁹³.



Рисунок 14.5. Развитие мужского бесплодия в виде порочного круга: нарушение иммунного ответа, воспаление, дисфункциональные расстройства гематотестикулярного барьера и «бедность» микробиоты = патогенез мужского бесплодия

¹⁹³ 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 Oct 23; 9(10):e110152. doi: 10.1371/journal.pone.0110152.

В ответ на инфекционный агент происходит нарушение целостности гематотестикулярного барьера, что запускает активацию местного иммунного ответа и приводит к синтезу и выделению медиаторов воспаления.

Эти медиаторы играют важную роль в иницировании и поддержании воспалительного процесса, что, в свою очередь, может приводить к дальнейшему разрушению тестикулярной ткани¹⁹⁴.

В ходе микробиологического анализа биоптатов яичек пациентов с азооспермией было установлено достоверное увеличение частоты выявления и относительной *abundancy* представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Xanthomonadaceae*, а также родов *Finnegoldia*, *Bifidobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Peptoniphilus* и *Pseudomonas* по сравнению с контрольной группой фертильных мужчин.

Особый клинический интерес представляет выявленная диссоциация в представленности рода *Prevotella* между разными типами азооспермии. У пациентов с необструктивной формой (НОА) наблюдалась значительная колонизация тестикулярной ткани представителями данного рода, в то время как в группе обструктивной азооспермии (ОА) их количество было статистически значимо ниже, вплоть до полного отсутствия в части образцов.

Данное наблюдение позволяет предположить потенциальную роль специфических бактериальных таксонов в патогенезе нарушения сперматогенеза, в частности, через механизмы индукции хронического воспаления, оксидативного стресса или прямого повреждения клеток Сертоли и герминативного эпителия. Данные изменения в микробной флоре могут указывать на потенциальные механизмы, лежащие в основе различий в репродуктивной функции между этими группами пациентов. Высокая концентрация *Prevotella* может свидетельствовать о положительном влиянии на здоровье репродуктивной системы, тогда как их недостаток у пациентов с ОА позволяет предположить наличие патогенетических процессов, приводящих к бесплодию¹⁹⁵.

Также следует отметить, что нарушение целостности гематотестикулярного барьера приводит к пролиферации количества тучных клеток в соединительной ткани, с последующим нарушением структуры микробиоты тестикул¹⁹⁶.

¹⁹⁴ Duan Y. G., Yu C. F., Novak N., Bieber T., Zhu C. H., Schuppe H. C., Haidl G., Allam J. P. Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *Int J Androl.* 2011 Dec; 34(6 Pt 2):e536-45. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01137.x.

¹⁹⁵ Yang H., Zhang J., Xue Z., Zhao C., Lei L., Wen Y., Dong Y., Yang J., Zhang L. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep.* 2020 Apr 23; 10(1):6876. doi: 10.1038/s41598-020-63787-x.

¹⁹⁶ Pasolli E., Asnicar F., Manara S., Zolfo M., Karcher N., Armanini F., Beghini F., Manghi P., Tett A., Ghensi P., Collado M. C., Rice B. L., Du Long C., Morgan X. C., Golden C. D.,

Тучные клетки (мастоциты) широко распространены в соединительных тканях и играют ключевую роль как в острых, так и в хронических воспалительных реакциях. Эти клетки содержат гранулы, в которых находятся различные медиаторы, включая триптазу, способствующую реакции воспаления. Триптаза, вырабатываемая мастоцитами, вызывает пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, что может привести к развитию фиброза и склероза в тканях. Этот процесс имеет важное значение для понимания патогенеза различных заболеваний, включая расстройства репродуктивной функции¹⁹⁷.

В нашем исследовании был проведен корреляционный анализ, который показал, что у пациентов с азооспермией и бедным микробным пейзажем встречается значительно большее количество мастоцитов в строме у пациентов группы 2 ($p < 0,05$). Интересно, что чем больше количество мастоцитов у пациентов с обструктивной азооспермией (ОА), тем меньше разнообразие их микробиоты в уретре. Эти наблюдения подчеркивают связь между воспалительными процессами, возникающими в результате активации мастоцитов, и микробиомом, что может указывать на патогенетические механизмы, связывающие воспаление и бесплодие.

Комплексный подход к диагностике мужского бесплодия служит основой для дальнейшего изучения причинно-следственных связей между микробиомом и иммунным ответом в естественных условиях. Это включает в себя изменения в количестве и типах иммунных клеток, которые могут оказывать значительное влияние на состояние репродуктивной системы. Установлено, что повреждения, вызванные мастоцитами в строме и канальцах яичек, взаимосвязаны с таксономической структурой микробиоты тестикулярной ткани. Кроме того, наши данные показывают, что яички пациентов с необструктивной азооспермией имеют значительно более разнообразный спектр микробных сообществ как на уровне семейств, так и родов по сравнению с пациентами с обструктивной азооспермией. Это различие предполагает, что микробиота может играть важную роль в поддержании репродуктивной функции, возможно, путем регуляции воспалительных процессов и стимуляции нормального сперматогенеза.

Quince C., Huttenhower C., Segata N. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*. 2019 Jan 24; 176 (3):649–662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.

¹⁹⁷ Jiménez M., Cervantes-García D., Córdova-Dávalos L. E., Pérez-Rodríguez M. J., Gonzalez-Espinosa C., Salinas E. Responses of Mast Cells to Pathogens: Beneficial and Detrimental Roles. *Front Immunol*. 2021 Jun 15; 12:685865. doi: 10.3389/fimmu.2021.685865.

Дальнейшие исследования в этом направлении могут не только определить новые диагностические критерии для азооспермии, но и предложить более целенаправленные стратегии для иммунной терапии. Особый интерес представляет возможность комбинированной иммунотерапии с препаратами, влияющими на микрофлору, что может оказаться более эффективным при лечении различных форм мужского бесплодия. Такие подходы смогут обогатить существующие методы лечения и улучшить их результаты, обеспечивая гармоничное взаимодействие между микробиотой, иммунной системой и реализацией репродуктивной функции.

Глава 15. Тучные клетки в сочетании с обеднением микробиома яичка как фактор необструктивного мужского бесплодия

15.1. Введение и актуальность

Сперматогенез является ключевым процессом в репродуктивной функции мужчин, отвечающим за продуцирование жизнеспособных сперматозоидов. Он представляет собой сложный и многогранный механизм, который включает в себя взаимодействие различных систем организма, таких как эндокринная, иммунная и микробиота. Исследования показывают, что нарушения в этих системах могут приводить к снижению как количества, так и качества сперматозоидов, что, в свою очередь, становится одной из основных причин мужского бесплодия. Кроме того, архитектура гематотестикулярного барьера и клеточный состав интерстиция яичка играют важную роль в защите спермогенетических клеток от иммунных клеток и потенциальных патогенов. Дисфункция этих структур может приводить к воспалительным процессам, нарушающим нормальный процесс сперматогенеза.

Тестикулярный компартмент, образованный стенкой семенных канальцев, состоит из множественных слоев клеток, включая гладкомышечные и перитубулярные клетки, а также внеклеточный матрикс. Эти структуры не только поддерживают нормальную анатомию яичка, но и участвуют в регуляции местной среды, способствующей процессам созревания половых клеток. Одним из важнейших защитных механизмов яичек является гематотестикулярный барьер, который предотвращает попадание иммунных клеток в область, где происходит развитие сперматозоидов¹⁹⁸. Это делает яички иммунопривилегированным органом, однако любое изменение в их архитектуре или клеточном составе интерстиция может оказывать негативное влияние на сперматогенез.

Среди иммунных клеток, присутствующих в интерстиции яичка, тучные клетки (мастоциты) имеют важное значение. В нормальных условиях эти клетки играют роль в поддержании гомеостаза и иммунной толерантности в репродуктивной системе. Однако в патологических ситуациях наблюдается значительное увеличение их численности, что может служить маркером воспалительных процессов.

¹⁹⁸ Haidl G., Duan Y. G., Chen S. J., Kohn F. M., Schuppe H. C., Allam J P. The role of mast cells in male infertility. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011 Sep; 7(5):627-34. doi: 10.1586/eci.11.57.

Согласно исследованию, Mayerhofer и коллег (2018), аккумуляция тучных клеток (мастоцитов) в интерстиции яичка ассоциирована с развитием хронического воспаления. Данный процесс отражает активацию локального иммунного ответа, сопровождающуюся секрецией провоспалительных медиаторов, включая гистамин и триптазу. Эти биологически активные вещества инициируют и поддерживают воспалительную реакцию, что потенциально приводит к повреждению тестикулярных структур и нарушению процессов сперматогенеза.

Было продемонстрировано, что мастоциты активно взаимодействуют с другими клеточными элементами стромы, в частности с фибробластами и перитубулярными клетками, потенцируя тем самым воспалительный каскад и способствуя ремоделированию тестикулярной архитектоники. Важным патогенетическим механизмом является способность активированных мастоцитов секретировать провоспалительные цитокины, которые нарушают целостность гематотестикулярного барьера. Повышение его проницаемости облегчает инфильтрацию иммунокомпетентных клеток в адлюминальное пространство семенных канальцев, где происходит развитие половых клеток, что может приводить к аутоиммунному повреждению гамет¹⁹⁹.

Это воздействие не только усугубляет воспаление, но и провоцирует более серьезные последствия, включая прогрессирующий фиброз и склероз тестикулярной ткани. Увеличение плотности тучных клеток в интерстиции яичка служит маркером персистирующего воспалительного процесса, который напрямую нарушает репродуктивную функцию и вносит существенный вклад в патогенез мужского бесплодия. Данная взаимосвязь подчеркивает необходимость дальнейшего изучения роли мастоцитов в тестикулярной патологии, включая их взаимодействие с клетками Сертоли, герминативным эпителием и перитубулярными миоидными клетками. Перспективным направлением представляется разработка таргетной-терапии, направленной на ингибирование активации мастоцитов или блокаду их медиаторов (например, использование стабилизаторов мембран тучных клеток или антагонистов гистаминовых рецепторов), что может открыть новые стратегии для сохранения фертильности у пациентов с хроническим тестикулярным воспалением.

Исследование Allen-Vercoe E. et al. (2013) подчеркивает критическую важность культуральных методов для углубленного понимания микробиоты кишечника. Авторы акцентируют, что традиционные методы секвенирования, хотя и информативны, не всегда способны раскрыть полную функциональную

¹⁹⁹ Mayerhofer A., Walenta L., Mayer C., Eubler K., Welter H. Human testicular peritubular cells, mast cells and testicular inflammation. *Andrologia*. 2018 Dec; 50(11):e13055. doi: 10.1111/and.13055.

сложность микробных сообществ, их метаболические взаимодействия и синергические связи. Совершенствование культуральных подходов позволяет выявлять редкие и труднокультивируемые микроорганизмы, которые могут играть ключевую роль в поддержании здоровья или развитии патологий²⁰⁰. В контексте мужской репродукции это особенно актуально.

Как демонстрирует работа Lundy et al. (2021), применение комплексного подхода, сочетающего высокопроизводительное секвенирование с продвинутыми культуральными методами и метагеномным анализом, позволяет не только охарактеризовать таксономический состав микробиома тестикулярной ткани, но и оценить его функциональный потенциал, метаболическую активность и взаимодействие с клетками хозяина. В частности, было показано, что дисбиоз кишечной микробиоты ассоциирован с изменениями в микробных сообществах семенной плазмы и мочи, что указывает на существование системной микробной оси, влияющей на репродуктивную функцию.

Более того, интеграция данных о влиянии внешних факторов, таких как диета и экология, с результатами анализа микробиома позволяет понять механизмы, через которые эти факторы модулируют состав и функцию микробных сообществ тестикулярной ткани. Например, определенные фитонутриенты и метаболиты растений могут опосредованно влиять на тестикулярный микробиом через модуляцию иммунной системы или изменение профиля короткоцепочечных жирных кислот, продуцируемых кишечной микробиотой²⁰¹.

Микробиом яичка характеризуется значительной межиндивидуальной вариабельностью, обусловленной комплексным влиянием экзогенных и эндогенных факторов. Как подчеркивается в обзоре Altmäe et al. (2019), ключевыми детерминантами формирования тестикулярного микробного сообщества являются образ жизни, особенности гигиены, сексуальное поведение (включая количество и разнообразие партнеров), а также характер питания.

Проведенный исследовательской группой анализ демонстрирует, что состав микробиома семенной жидкости напрямую коррелирует с параметрами фертильности. Было установлено, что доминирование *Lactobacillus* spp. ассоциировано с улучшением морфофункциональных характеристик сперматозоидов, в то время как повышенная представленность условно-патогенных таксонов (*Prevotella*, *Gardnerella*) коррелирует с олигозооспермией и повышением уровня фрагментации ДНК.

²⁰⁰ Allen-Vercoe E. Bringing the gut microbiota into focus through microbial culture: recent progress and future perspective // Current opinion in microbiology. 2013. Т. 16. № 5. P. 625–629.

²⁰¹ Lundy S. D., Sangwan N., Parekh N. V., Selvam M. K. P., Gupta S., McCaffrey P., Bessoff K., Vala A., Agarwal A., Sabanegh E. S., Vij S. C., Eng C. Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. Eur Urol. 2021 Jun; 79(6):826–836. doi: 10.1016/j.eururo.2021.01.014.

Модифицируемые факторы образа жизни оказывают существенное влияние на тестикулярный микробиом:

- курение и алкоголь индуцируют дисбиотические изменения через оксидативный стресс и нарушение микробного метаболизма;

- низкая физическая активность ассоциирована с уменьшением разнообразия микробного сообщества;

- хронический стресс модулирует микробиом через активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.

Особого внимания заслуживает роль диеты. Потребление пищевых волокон, полифенолов и ферментированных продуктов способствует обогащению микробиома короткоцепочечными жирными кислотами и противовоспалительными метаболитами. Пробиотические штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* демонстрируют способность к модуляции иммунного ответа и снижению интенсивности оксидативного стресса в репродуктивных тканях.

Перспективным направлением является разработка персонализированных интервенций, направленных на коррекцию микробиома через модификацию образа жизни и целевое применение пробиотиков для улучшения репродуктивных исходов²⁰². Следует отметить и тот факт, что и иммунный ответ в каждом отдельном случае будет персонализирован.

Учитывая вышеизложенное, целью данного клинического наблюдения стало изучение связи между таксономическим микробным разнообразием микробиома и активностью тучных клеток в яичке у конкретного мужчины с секреторным бесплодием.

15.2. Клиническое наблюдение

Пациент: А., 34 года. Семейный статус: женат 2 года. Ритм половой жизни — 2–3 раза в неделю без применения контрацепции. В предыдущих браках не состоял, детей не имеет. Женский фактор бесплодия исключен.

Анамнез заболевания: впервые обратился к андрологу год назад с целью обследования по поводу отсутствия наступления беременности с учетом половой жизни без применения средств контрацепции. Ранее в медицинские учреждения по данной проблеме не обращался. По результатам спермограммы была установлена олигоастенозооспермия. В течение года пациент получал консервативное лечение, в том числе антиоксидантную терапию, полиненасы-

²⁰² Altmäe S., Franasiak J. M., Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology* volume 16, pages 703–721 (2019). doi: 10.1038/s41585-019-0250-y. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732723.

щенные жирные кислоты омега-3 и микроэлементы. Однако показатели эякулята не улучшились. Учитывая отсутствие эффекта от проводимой терапии обратился вновь в Центр репродуктивной и клеточной медицины, где при повторном обследовании была диагностирована азооспермия.

Физикальное обследование: пациент имеет нормостеническое телосложение, рост 182 см, индекс массы тела 23,64 кг/м². Рост волос на теле соответствует мужскому типу. Оба яичка нормально расположены в мошонке, вены семенных канатиков не расширены.

Клинические исследования: Кариотип: 46 XY. Спермограмма (по методике ВОЗ, 2010): объем 1,8 мл, цвет серо-желтый, консистенция умеренно-вязкая, разжижение через 40 минут, pH 7,2. Сперматозоиды отсутствуют, лейкоциты — 0,2 млн/л, лецитиновые зерна — в скудном количестве, Ig G < 22%. Ультразвуковое исследование не выявило изменений в размерах и структуре яичек, вены семенных канатиков не расширены.

Гормональный профиль: Показатели представлены в табл. 15.1.

Таблица 15.1. Показатели уровней гормонов пациента А

Гормоны (единицы измерения)	Результат	Референсный интервал
Фолликулостимулирующий гормон (мМЕ/мл)	19,4*	1,5–12,4
Лютеинизирующий гормон (мМЕ/мл)	5,14	1,7–8,6
Пролактин (мМЕ/мл)	273	97,0–449,0
Эстрадиол (пг/мл)	34,4	7,6–42,6
Общий тестостерон (нг/мл)	3,9	2,4–8,3

* Показатель, который находится за пределами референсного интервала

15.3. Результаты

На основании лабораторно-клинических данных пациенту А. был поставлен диагноз: первичное мужское бесплодие, гипергонадотропный гипогонадизм и необструктивная азооспермия. В связи с отсутствием половых клеток в эякуляте пациенту была выполнена открытая биопсия яичка (TESE). Однако полученного материала для криоконсервации оказалось недостаточно. Ткань, полученная из яичка, а также образцы мазков из уретры были отправлены на патогистологическое и иммуногистохимическое исследование, а также на высокопроизводительное секвенирование (NGS) для анализа микробиоты.

Исследование также включало фиксацию биоптатов яичка в нейтральном 10% растворе формалина на 2–3 дня с последующей окраской гистологических срезов. Оценка качества сперматогенеза проводилась на срезах яичка, окрашенных гематоксилином и эозином, а детекция тучных клеток осуществлялась с использованием иммуногистохимической окраски с анти-MCT (Anti-Mast Cell Tryptase).

Согласно результатам секвенирования ампликонов гена 16S рРНК, было проведено исследование таксономического состава микробиоты уретры и ткани яичка.

Микробиота уретры:

Среди классифицированных таксонов преобладали представители родов *Staphylococcus* (57,9%, тип Firmicutes), *Corynebacterium* (13,7%, тип Actinobacteriota) и неопределенный представитель класса Clostridia (7,1%, тип Firmicutes). Это указывает на разнообразное микробиологическое сообщество, где доминирующие таксоны могут играть роль как в нормальной, так и в патогенетической микробиологии.

Микробиота ткани яичка:

Ткань яичка продемонстрировала бедность сообществ с абсолютным преобладанием рода *Serratia* (99,7%, тип Proteobacteria). *Serratia*, как правило, считается сапрофитом, однако при определенных условиях может проявлять патогенные свойства, что может быть особенно актуально в контексте бесплодия. Наличие дополнительных представителей — *Ohtaekwangia* (0,2%, тип Bacteroidota) и *Lactococcus* (0,1%, тип Firmicutes) — указывает на низкое разнообразие микробиоты в ткани яичка, что может свидетельствовать о патологии.

Таким образом, микробиом яичка у пациента А. характеризуется доминированием *Serratia*, что может указывать на неблагоприятные изменения в микробиологическом составе, связанные с его репродуктивным здоровьем. Сниженное бактериальное разнообразие может быть одной из причин неблагоприятных исходов по сперматогенезу и бесплодию (рис. 15.1).

Анализ морфологии яичка, окрашенных гематоксилином и эозином, продемонстрировал значительные изменения в структуре семенных канальцев и интерстициальной ткани. Одним из ключевых находок стал синдром клеток Сертоли, который был выявлен во всех извитых семенных канальцах яичка. Это состояние характеризуется тем, что клетки Сертоли, отвечающие за поддержку и питание развивающихся сперматозоидов, не способны выполнять свои функции. В результате это может приводить к нарушению сперматогенеза и бесплодию (рис. 15.2).

При утвержденной морфологической картине наблюдается также изменение базальной мембраны извитых семенных канальцев, где фиксировались очаги фиброза. Фиброз является патологическим процессом, при котором происходит замещение нормальной ткани соединительной тканью, что часто ведет к потере функциональности. В этом случае, фиброз в области базальной мембраны может ослабить физическую поддержку семенных канальцев, ухудшая условия для нормального развития сперматозоидов.

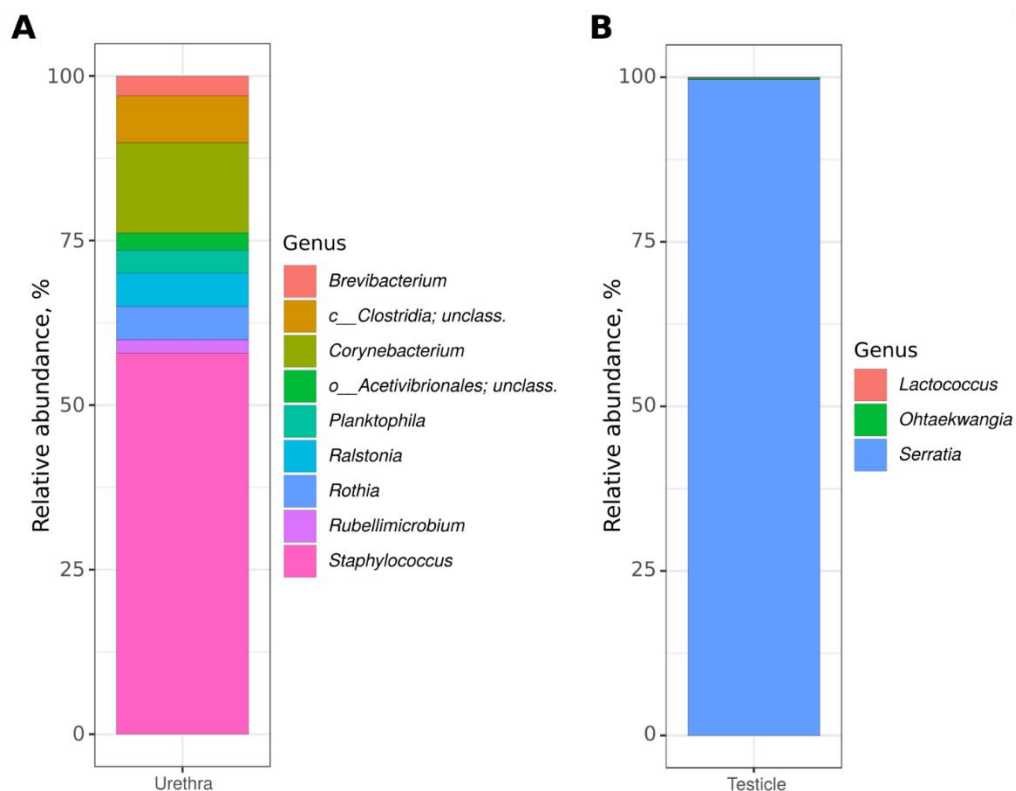


Рисунок 15.1. Таксономический состав бактериального сообщества исследуемых образцов на уровне родов, выявленный методом секвенирования ампликонов гена 16S рРНК.

А. Микробиота уретры. В. Микробиота ткани яичка

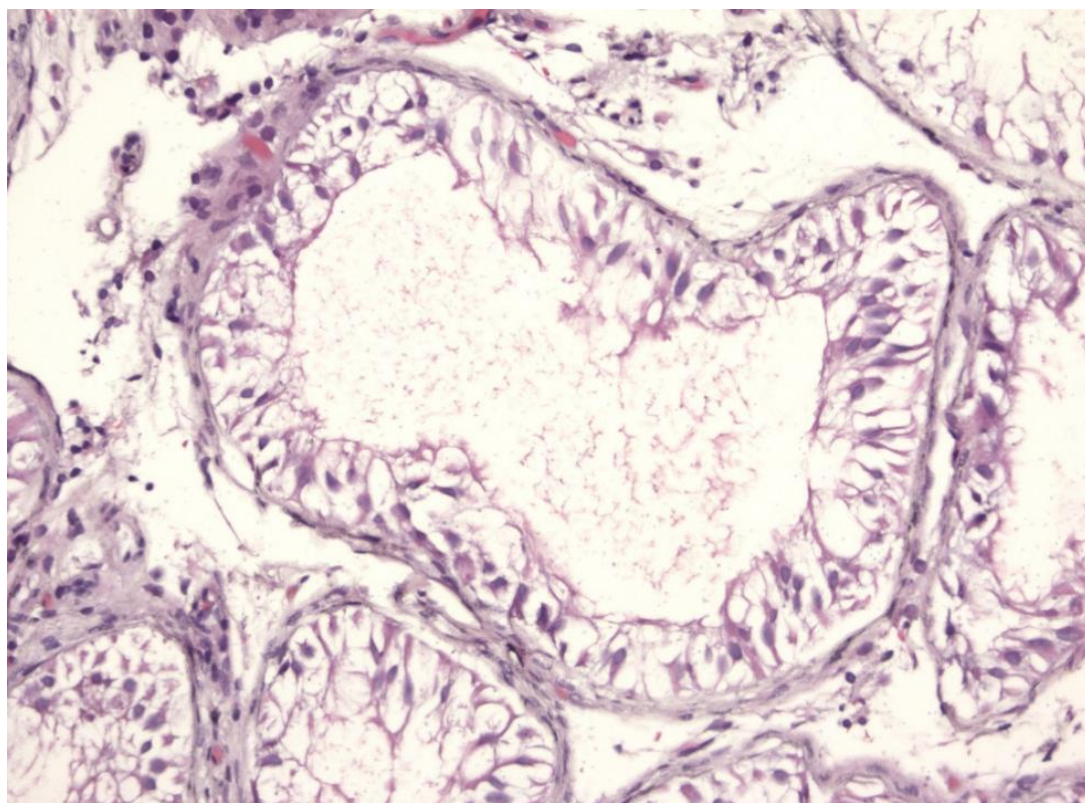


Рисунок 15.2. Яичко пациента А. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$.

Нарушение сперматогенеза — синдром клеток Сертоли во всех извитых семенных канальцах яичка, базальная мембрана извитых семенных канальцев с очагами фиброза, полнокровные сосуды

Кроме того, в срезах также наблюдалось полнокровие сосудов, что указывает на возможные проблемы с микроциркуляцией и может быть следствием воспалительных процессов или ишемии. Эти изменения, в сочетании с другими характеристиками, такими как лейкоцитарная инфильтрация, подтверждают наличие воспалительного реагирования в яичках пациента. Лейкоцитарная инфильтрация, особенно в интерстиции яичка, свидетельствует о внедрении иммунных клеток, что может быть связано с аутоиммунными процессами или инфекциями.

На основе проведенного анализа количество тучных клеток в 1 мм² интерстиция яичка составило 114,7, из которых доля интерстициальных тучных клеток достигла 63,8%, а перитубулярных — 36,2%, что достоверно визуализируется при иммуногистохимической окраске с анти-МСТ (Anti-Mast Cell Tryptase) (рис. 15.3). Тесный контакт тучных клеток со стенкой извитых семенных канальцев может оказывать негативное влияние на гематотестикулярный барьер, который играет критическую роль в создании защищенной среды для сперматогенеза. Повреждение этого барьера и взаимодействие тучных клеток с другими клетками могут препятствовать нормальному развитию сперматозоидов, что дополнительно усугубляет проблему бесплодия.

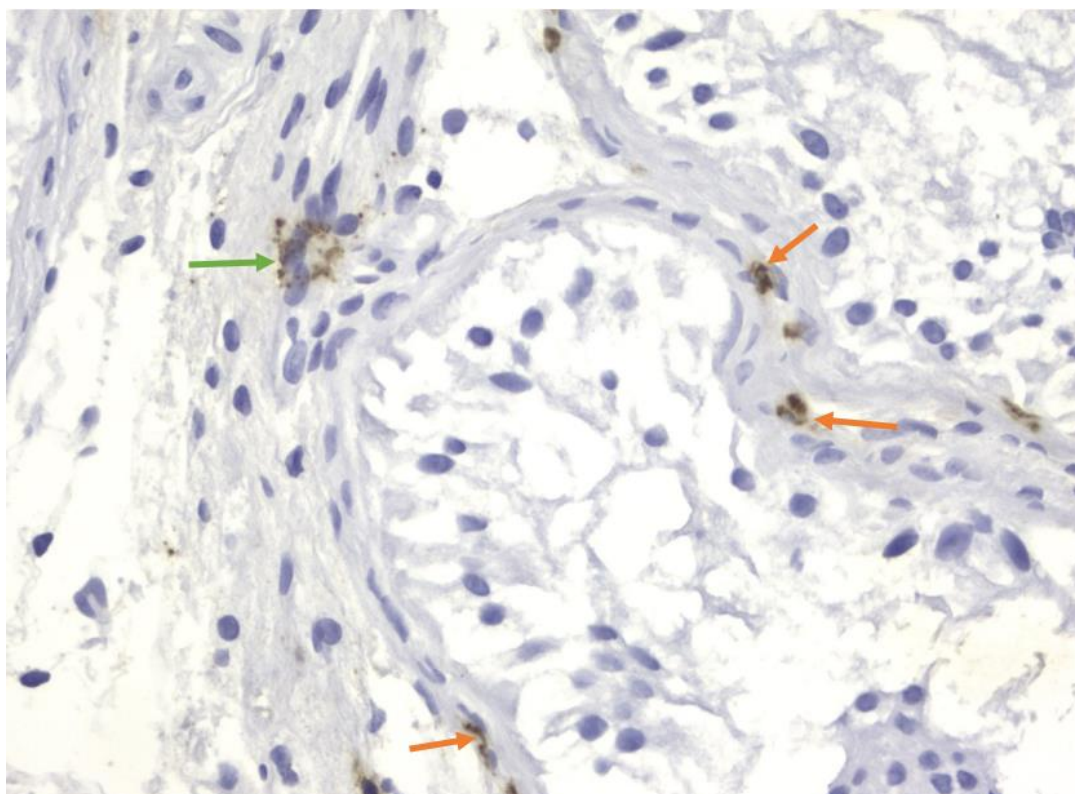


Рисунок 15.3. Яичко пациента А. Иммуногистохимическая окраска с анти-МСТ (Anti-Mast Cell Tryptase). Увеличение $\times 40$. Зеленая стрелка указывает на тучную дегранулированную триптаза-позитивную тучную клетку, которая находится в интерстиции яичка. Красные стрелки указывают на триптаза-позитивные тучные клетки, которые находятся перитубулярно

Учитывая вышеизложенное, можно сделать обоснованный вывод о том, что у пациента А. существует значительное ухудшение состояния репродуктивного органа, которое обусловлено патологиями, связанными с фиброзом, воспалением и нарушениями в сперматогенезе. Это делает перспективы консервативного и хирургического лечения мужского бесплодия крайне ограниченными. В связи с этим паре было предложено рассмотреть выполнение протокола вспомогательных репродуктивных технологий с использованием донорских сперматозоидов как единственный возможный вариант для достижения беременности.

15.4. Обсуждение и выводы

Инфекции урогенитального тракта признаны значимым этиологическим фактором мужского бесплодия, индуцирующим хроническое воспаление тестикулярной ткани с последующим повреждением сперматогенного эпителия²⁰³. Даже после успешной эрадикации патогена восстановление полноценного сперматогенеза может занимать свыше трех месяцев, что связано с персистенцией провоспалительных медиаторов и оксидативного стресса²⁰⁴. При хроническом и рецидивирующем воспалении активированные иммунные клетки продуцируют биологически активные вещества (цитокины, хемокины, активные формы кислорода), которые оказывают прямое повреждающее действие на герминативные клетки и опосредуют нарушения сперматогенеза через механизмы апоптоза и нарушения целостности гематотестикулярного барьера²⁰⁵.

Согласно первым и наиболее значимым исследованиям, Alfano и соавторов, у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией был зафиксирован преобладающий состав микробиоты, состоящий из Firmicutes и Actinobacteria, с пониженным количеством Bacteroidetes и Proteobacteria ($P = 0,00002$). Указанные таксономические сдвиги могут отражать нарушение микробного гомеостаза как потенциальный предиктор дисфункции сперматогенеза, возможно, через модуляцию локального иммунного ответа и метаболических процессов в семенных каналах.

²⁰³ Pellavio G., Ritta M., Merlo M. et al. Regulation of Androgen Receptor Signaling by MicroRNAs in Human Testicular Germ Cell Tumors. *World J Mens Health*. 2022; 40(2):305-317. doi: 10.5534/wjmh.210118.

²⁰⁴ Fijak M., Pilatz A., Hedger M. P. et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update*. 2018; 24(4):416–441. doi: 10.1093/humupd/dmy009.

²⁰⁵ La Vignera S., Cannarella R., Condorelli R. A. et al. The Role of the HPG Axis in the Pathogenesis of Male Infertility: The Relationship between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Male Infertility. *J Clin Med*. 2021; 10(8):1776. Published 2021 Apr 20. doi: 10.3390/jcm10081776.

Другое исследование, проведенное Molina и коллегами, выявило, что род бактерий *Prevotella* часто встречается в тканях яичек у бесплодных мужчин. Наблюдение этого рода можно интерпретировать как наличие негативного влияния на сперматогенез, что также может быть связано с прогрессирующими воспалительными процессами и изменениями в гематотестикулярном барьере. В контексте мужского бесплодия особое внимание следует уделить тому, как микробиота яичек может влиять на репродуктивное здоровье. *Bacteroidetes* обладают противовоспалительными свойствами, которые помогают поддерживать здоровый баланс микробиоты. Снижение их числа при повышении *Firmicutes* и *Actinobacteria* может привести к ухудшению состояния воспаления и дальнейшему разрушению сперматогенного эпителия²⁰⁶.

Мастоциты высвобождают протеазы для участия в различных физиологических процессах, однако в определенных условиях это может привести к повреждению тканей и усилению воспалительных реакций. Исследование Welter и коллег подчеркивает, что ангиотензин II оказывает влияние на функцию перитубулярных клеток яичка через рецептор AT1, что представляет собой специфическую ситуацию в контексте мужского бесплодия. Это воздействие может быть связано с изменениями в активности тучных клеток и их медиаторах, что, в свою очередь, может неблагоприятно сказываться на репродуктивном здоровье. Таким образом, несмотря на первоначально защитную роль тучных клеток, их активность может играть негативную роль в патологических состояниях, таких как бесплодие, особенно в контексте воздействия биологически активных веществ, вырабатываемых при воспалительных процессах²⁰⁷.

Тучные клетки (ТК) в мужском уrogenитальном тракте в основном находятся в соединительной ткани белочной оболочки яичка и придатка яичка. У человека они присутствуют в значительном количестве как непосредственно под белочной оболочкой яичка, так и в интерстициальной ткани между семенными каналами. Образование тучных клеток в семенниках начинается уже в плодном периоде, с увеличением их числа в младенчестве. Затем, по мере роста и развития, количество тучных клеток уменьшается в детстве, а вновь увеличивается с началом полового созревания.

²⁰⁶ Molina N. M., Plaza-Díaz J., Vilchez-Vargas R., Sola-Leyva A., Vargas E., Mendoza-Tesarik R., Galán-Lázaro M., Mendoza-Ladrón de Guevara N., Tesarik J., Altmäe S. (2021). Assessing the testicular sperm microbiome: A low-biomass site with abundant contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 43(3), 523–531. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.06.021.

²⁰⁷ Welter H., Huber A., Lauf S., Einwang D., Mayer C., Schwarzer J. U., Mayerhofer A. (2014). Angiotensin II regulates testicular peritubular cell function via AT1 receptor: A specific situation in male infertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2), 171–178. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.011.

Исследование Meineke и соавторов подтверждает, что у мужчин с бесплодием наблюдается повышенное количество тучных клеток, а также измененное распределение этих клеток в яичках. Тучные клетки в яичках человека содержат триптазу — протеазу, которая связана с различными физиологическими функциями и может играть роль в патогенезе бесплодия. Увеличение числа тучных клеток и их аномальное распределение как в интерстициальной ткани, так и в участках, окружающих семенные каналы, может указывать на их участие в воспалительных процессах. Это может негативно сказываться на сперматогенезе и в целом на репродуктивной функции²⁰⁸. Увеличение количества интерстициальных тучных клеток в яичках человека считается значимым фактором, который может приводить к нарушениям в морфологии яичка и нарушению сперматогенеза.

Согласно исследованию, Hussein и соавторов, было проведена фенотипическая характеристика иммунных и тучных клеток в тестикулах человека, что позволило установить связь между их количеством и состоянием сперматогенеза. Авторы пришли к выводу, что увеличение числа интерстициальных тучных клеток может способствовать развитию патологий в морфологии яичка, поскольку эти клетки вырабатывают биологически активные вещества, способствующие воспалению и повреждению окружающих тканей. В частности, увеличение ТК может быть связано с нарушением нормального функционирования сперматогенного эпителия, что приводит к последствиям, таким как олигоастенозооспермия или даже азооспермия²⁰⁹.

Исследование Schmid и коллег также подчеркивает важность клеток, окружая семенные каналы, включая перитубулярные клетки, в поддержании нормального сперматогенеза. Исследования на приматах показали, что изменения в морфологии этих клеток могут существенно влиять на их функциональные характеристики. Так как ТК могут взаимодействовать с перитубулярными клетками, изменения в их численности и активности могут влиять на состояние гематотестикулярного барьера и, следовательно, на возможность нормального развития сперматозоидов²¹⁰.

²⁰⁸ Meineke V., Frunghieri M. B., Jessberger B., Vogt H., Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: Increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 2000.

²⁰⁹ Hussein M. R., Abou-Deif E. S., Bedaiwy M. A., Said T. M., Mustafa M. G., Nada E., Ezat A., Agarwal A. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 2005, 83, 1447–1453.

²¹⁰ Schmid N., Stöckl J. B., Flenkenthaler F., Dietrich K. G., Schwarzer J. U., Köhn F. M., Drummer C., Fröhlich T., Arnold G. J., Behr R., Mayerhofer A. Characterization of a non-human primate model for the study of testicular peritubular cells-comparison with human testicular peritubular cells. *Mol Hum Reprod.* 2018 Aug 1; 24(8):401–410. doi: 10.1093/molehr/gay025.

Впервые анализ содержания тучных клеток в яичках был проведен Agarwal и соавторами в конце прошлого века. В их исследовании был осуществлен сравнительный подсчет количества тучных клеток в 1 мм² ткани яичка среди группы мужчин с бесплодием, включая олигозооспермию и азооспермию, и среди здоровых мужчин²¹¹.

Авторы заметили, что наличие повышенного количества тучных клеток в интерстиции яичка коррелировало с уровнем нарушений сперматогенеза. В частности, у мужчин, у которых уровень сперматогенеза оценивался на уровне 1–4 баллов по шкале Джонсона, количество мастоцитов было значительно выше — 57,7 клеток/мм² — по сравнению с показателями в группе здоровых мужчин. Разница была статистически значимой ($P < 0,001$), что подчеркивает важность тучных клеток в контексте мужского бесплодия.

Эти результаты указывают на то, что увеличение числа тучных клеток может быть связано с нарушением сперматогенеза и, следовательно, с бесплодием. Тучные клетки, как известно, участвуют в воспалительных процессах и могут высвобождать различные медиаторы, оказывающие разрушительное воздействие на сперматогенный эпителий. Таким образом, работа Agarwal и соавторов подчеркивает важность изучения роли тучных клеток не только как простых элементов иммунной системы, но и как факторов, способствующих патогенезу бесплодия у мужчин.

Исследование, проведенное Ара DD и его коллегами в 2002 году, было посвящено изучению роли тучных клеток в контексте мужского бесплодия. Основные аспекты исследования:

— Оценить количество и активность тучных клеток в яичках мужчин с бесплодием по сравнению со здоровыми мужчинами.

— Исследовать связь между количеством тучных клеток и фиброзом интерстиция и перитубулярной области яичек.

Для достижения цели авторы проводили биопсию тканей яичек пациентов. Использовали количественное определение тучных клеток с помощью анализа содержания триптазы — фермента, который они продуцируют. Также оценивали уровень фиброза в интерстициальных тканях с помощью иммуногистохимического анализа для оценки содержания виментина и альфа-гладкомышечного актина. В результате было установлено, что у бесплодных мужчин значительное увеличение общего числа тучных клеток и интерстициальных тучных клеток, продуцирующих триптазу, по сравнению с контрольной группой. Статистически значимые различия были получены ($p = 0,04$ и $p = 0,024$

²¹¹ Agarwal S, Choudhury M, Banerjee A. Mast cells and idiopathic male infertility. *Int J Fertil.* 1987 Jul-Aug; 32(4):283–6.

соответственно), что подтверждает гипотезу о связи между активностью тучных клеток и бесплодием. Авторы пришли к выводу, что тучные клетки могут играть патогенную роль в развитии бесплодия у мужчин, так как их активность связана с повреждением сперматогенеза. Увеличение числа тучных клеток и их активности может способствовать воспалительным процессам, которые, в свою очередь, приводят к склерозу и атрофии семенных канальцев²¹²

Исследование, проведенное Haidl и его коллегами в 2011 году, рассматривало важность ТК в контексте мужского бесплодия, подчеркивая их местоположение и влияние на репродуктивную функцию. Основное внимание уделялось взаимосвязи между расположением тучных клеток, состоянием половых клеток и фертильностью. Научной группой были поставлены следующие цели:

- изучить распределение и миграцию тучных клеток в различных отделах яичка у мужчин с бесплодием;
- проанализировать влияние расположения тучных клеток на функциональное состояние зародышевых клеток и фертильность.

Для достижения цели авторы использовали статистические и морфометрические анализы, чтобы оценить распределение тучных клеток в биопсиях яичек мужчин с бесплодием с учетом анатомических особенностей яичка, включая толщину стенки семенных канальцев и состояние гематотестикулярного барьера. Исследование показало, что близкое расположение тучных клеток к семенным канальцам имеет важное значение для патологии бесплодия и чем ближе тучные клетки расположены к зародышевым клеткам, тем более потенциально они могут оказывать негативное влияние на фертильность через секретируемые ими медиаторы, такие как гистамин, серотонин и различные цитокины. Также в процессе исследования было установлено, что наличие сильно увеличенного числа тучных клеток в тканях яичка у бесплодных мужчин коррелировало с ухудшением качества спермы и нарушением сперматогенеза.²¹³

Настоящее исследование продемонстрировало, что увеличение числа тучных клеток в яичках, особенно в состоянии дегрануляции и находящихся в тесном контакте с семенными канальцами, свидетельствует о связи между пролиферацией тучных клеток и нарушением функционирования гематотестикулярного барьера. В дополнение, у пациента было обнаружено обеднение микробного пейзажа яичка с абсолютным преобладанием представителей филой *Proteobacteria*, в частности рода *Serratia*.

²¹² Apa D. D., Cayan S., Polat A., Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. Arch Androl. 2002 Sep-Oct; 48(5):337–44. doi: 10.1080/01485010290099183.

²¹³ Haidl G., Duan Y. G., Chen S. J., Kohn F. M., Schuppe H. C., Allam J P. The role of mast cells in male infertility. Expert Rev Clin Immunol. 2011 Sep; 7(5):627–34. doi: 10.1586/eci.11.57.

Исходя из этих наблюдений, можно предположить, что преобладание триптаза-активных тучных клеток может стимулировать активность фибробластов и синтез коллагена, что, в свою очередь приводит к фиброзу и склерозу тканей. Данные результаты находят поддержку в исследованиях Haidl и его коллег, которые указывали на то, что активация тучных клеток способствует фиброзным процессам в яичках, что отрицательно сказывается на проницаемости гематотестикулярного барьера.

На примере данного клинического случая мы впервые указываем на то, что увеличение числа триптаза-позитивных тучных клеток в сочетании с обеднением микробиома яичка может способствовать развитию мужского бесплодия. Тем не менее на сегодняшний день остаются неясными сигнальные механизмы, лежащие в основе данного процесса, что требует дальнейшего детального изучения. Это открытие может служить платформой для будущих исследований, направленных на выяснение молекулярных и клеточных механизмов влияния тучных клеток на гематотестикулярный барьер и в конечном итоге на мужскую фертильность.

Заключение

Проведенный в рамках данной монографии комплексный анализ, включающий пионерский для Российской Федерации проект с применением высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS), окончательно подтверждает статус тестикулярного микробиома как неотъемлемого и физиологически значимого компонента репродуктивной системы мужчины. Впервые в отечественной когорте пациентов с различными формами азооспермии был определен исчерпывающий качественный и количественный профиль микробных сообществ паренхимы яичка. Полученные данные позволили идентифицировать уникальные для данной популяции дисбиотические нарушения, ассоциированные с нарушением сперматогенеза.

Ключевым выводом работы является установление конкретных патогенетических механизмов, связывающих дисбиоз тестикулярной микробиоты с развитием тяжелых форм мужского бесплодия. Наши данные демонстрируют, что изменение состава микробного сообщества, в частности, снижение представленности *Lactobacillus* и увеличение доли *Prevotella*, *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*, напрямую коррелирует с активацией локального иммунного ответа и инфильтрацией интерстиция тучными клетками. Последующая дегрануляция мастоцитов и выброс гистамина, триптазы и провоспалительных цитокинов приводят к нарушению целостности гематотестикулярного барьера, что подтверждалось гистологически и методами иммунофлуоресценции в нашем исследовании. Это, в свою очередь, инициирует аутоиммунные реакции против развивающихся половых клеток и усугубляет повреждение сперматогенного эпителия.

Социальная значимость проблемы подчеркивается растущей ролью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) как основного инструмента преодоления infertility. Полученные нами данные о взаимосвязи состава микробиома и эффективности получения сперматозоидов при TESE/microTESE открывают путь к разработке новых предиктивных алгоритмов. Определение специфических бактериальных маркеров (как выявленных в нашем исследовании) может лечь в основу создания неинвазивных диагностических тестов для прогнозирования исходов ВРТ и отбора пациентов для таргетной коррекции микробиома.

Перспективным направлением, вытекающим из результатов работы, является разработка персонализированных стратегий управления фертильностью, включающих:

— коррекцию тестикулярного и системного микробиома с помощью таргетной антибиотикотерапии, пробиотиков (на основе аутентичных штаммов *Lactobacillus*, выделенных в ходе исследования) и пребиотиков;

— модуляцию иммунного ответа через ингибирование активации тучных клеток;

— разработку протоколов эмпирической терапии для пациентов с идиопатическим бесплодием перед планированием ВРТ.

В перспективе дальнейшие исследования должны быть сфокусированы на установлении причинно-следственных связей между конкретными таксонами микробиоты и функциями клеток Сертоли и Лейдига, а также на изучении механизмов межорганного взаимодействия вдоль оси «кишечник — яичко» с применением созданного в рамках работы биобанка образцов. Интеграция мультиомиксных технологий (метагеномики, метаболомики, протеомики) позволит создать целостную модель регуляции репродуктивной функции.

Таким образом, данная монография не только вносит значительный вклад в фундаментальное понимание роли тестикулярного микробиома в норме и патологии, но и предоставляет первые на территории России практические инструменты для перехода к персонализированной андрологии, направленной на восстановление естественной фертильности и повышение эффективности ВРТ.

Список литературы

1. Бородинов А. Г. и др. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) // Научное приборостроение. — 2020. — Т. 30. — №. 4. — С. 3–20.
2. Кадыров З. А., Степанов В. С., Алдыраков Э. М., Мошеинашвили Ш. Г. Микробиота органов урогенитальной системы. Урология. 2021; 6:136–140. doi: 10.18565/urology.2021.6.136–140.
3. Осипов Г. А., Родионов Г. Г. Микрoэкология человека в норме и патологии по данным масс-спектрометрии микробных маркеров. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях 2013;(2):43–53.
4. Попова А. Ю. и др. Варикоцеле и необструктивная азооспермия — с чего начать? // Андрология и генитальная хирургия. — 2017. — Т. 18. — №. 4. — С. 77–80.
5. Рассказы о великом бактериологе С. Н. Виноградском / Сост.: Ю. А. Мазинг, Т. В. Андрюшкевич, Ю. П. Голиков; Пер. С. Борисова под ред. Ю. А. Мазинга. — СПб. Росток, 2002. — 320 с. — (Фундаментальная наука). — 1000 экз. — ISBN 5-94668-008-0.
6. Рахматулина М. Н., Болдырева М. Н., Липова Е. В., Чекмарев А. С., Галкина И. С. Оценка состава микробиоты мочеиспускательного канала у мужчин с инфекциями, передающимися половым путем. Урология. 2019;(6):31–37.
7. Урология. Российские клинические рекомендации / Под ред. Ю. Г. Аляева, П. В. Глыбочко, Д. Ю. Пушкаря. — М.: Медфорум, 2018. — 544 с.
8. Фаниев М. В., Кадыров З. А., Дружинина Н. К., Степанов В. С., Прокопьев Я. В., Федоренко Т. В. Сравнительная характеристика тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле. Экспериментальная и клиническая урология. 2023; 16(4):80–91; doi: 10.29188/2222-8543-2023-16-4-80-91.
9. Abdel-Hamid A. A. M., Atef H., Zalata K. R., Abdel-Latif A. Correlation between testicular mast cell count and spermatogenic epithelium in non-obstructive azoospermia. Int. J. Exp. Pathol. 2018 Feb; 99(1):22–28. doi: 10.1111/iep.12261.
10. Agarwal S., Choudhury M., Banerjee A. Mast cells and idiopathic male infertility. Int. J. Fertil. 1987 Jul-Aug; 32(4):283–6.
11. Alfano M., Ferrarese R., Locatelli I., Ventimiglia E., Ippolito S., Gallina P., Cesana D., Canducci F., Pagliardini L., Viganò P., Clementi M., Nebuloni M., Montorsi F., Salonia A. Testicular microbiome in azoospermic men—first evidence of the impact of an altered microenvironment Hum. Reprod. 2018 Jul 1; 33(7):1212–1217. doi: 10.1093/humrep/dey116. PMID: 29850857; PMCID: PMC6012977.
12. Alfano M., Ventimiglia E., Locatelli I., Capogrosso P., Cazzaniga W., Pederzoli F., Frego N., Matloob R., Sacca A., Pagliardini L. et al. Anti-mullerian hormone-to-testosterone ratio is predictive of positive sperm retrieval in men with idiopathic non-obstructive azoospermia. Sci Rep 2017; 7:17638.
13. Allen-Vercoe E. Bringing the gut microbiota into focus through microbial culture: recent progress and future perspective. Current opinion in microbiology. 2013 Oct; 16(5):625–9. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.008. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24148301; PMCID: PMC3859468.

14. Almeida O. G. G., De Martinis E. C. P. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Jan; 103(1):69–82. doi: 10.1007/s00253-018-9464-9. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30362076.
15. Altmäe S., Fransiak J. M., Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology* volume 16, p. 703–721 (2019). doi: 10.1038/s41585-019-0250-y. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732723.
16. Antunes-Lopes T., Vale L., Coelho A. M. et al. The Role of Urinary Microbiota in Lower Urinary Tract Dysfunction: A Systematic Review. *Eur Urol Focus*. 2018 Sep 27. pii: S2405-4569(18)30283-9. doi: 10.1016/j.euf.2018.09.011.
17. Apa D. D., Cayan S., Polat A., Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl*. 2002 Sep-Oct; 48(5):337–44. doi: 10.1080/01485010290099183.
18. Aziz Sancar, Laura A. Lindsey-Boltz, Keziban Ünsal-Kaçmaz, Stuart Linn. (2004). *Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints*. *Annu. Rev. Biochem*. 73, 39–85.
19. Baazeem A., Belzile E., Ciampi A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol*. 2011; 60(4):796-808. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.018.
20. Baazeem A., Zini A. (2018). Microsurgical varicocelectomy for the treatment of clinical varicocele: an update. *Asian Journal of Andrology*, 20(2), 101–105.
21. Bae H. S., Im W. T., Lee S. T.: *Lysobacter concretions* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1155–1161, 2005.
22. Baker J. M., Al-Nakkash L., Herbst-Kralovetz M. M. Estrogen-gut microbiome axis: physiological and clinical implications. *Maturitas* 2017; 103:45–53.
23. Baqui A. H. et al. Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh // *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2019. T. 98. № 3. C. 309–319. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019 Mar; 98(3):309–319. doi: 10.1111/aogs.13492. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30346023; PMCID: PMC6389396.
24. Barbara van der Pol, David E. Nelson. *Microbial Communities of the Male Urethra* Published: 27 January 2016. doi: 10.1128/9781555819071.ch13.
25. Barbonetti A. et al. (2016). Relationship between sexually transmitted bacterial pathogens and semen parameters in infertile men with and without leukocytospermia. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(1), 27–34. doi: 10.1007/s40618-015-0343-2.
26. Baud D., Pattaroni C., Vulliamoz N., Castella V., Marsland B. J., Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol*. 2019. 12 февраля. 10:234. doi: 10.3389/fmicb.2019.00234. PMID: 30809218; PMCID: PMC6379293.
27. Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R., Roller C. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep; 36(9):2748-51. doi: 10.1128/JCM.36.9.2748-2751.1998. PMID: 9705429; PMCID: PMC105199.
28. Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Vergès M. C., Charles T. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020 Jun 30; 8(1):103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.
29. Biesalski H. K. Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Ann NY Acad Sci* 2016; 1372:53–64.

30. Boguen R., Treulen F., Uribe P., Villegas J. V. Ability of *Escherichia coli* to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. *FertilSteril*. 2015 May; 103(5):1155-61. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.044. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25747129.
31. Boitrelle F. et al. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life* (Basel). 2021; 11(12):1368. doi: 10.3390/life11121368.
32. Bokulich N. A., Chung J., Battaglia T., Henderson N., Jay M., Li H., D. Lieber A., Wu F., Perez-Perez G. I., Chen Y., Schweizer W., Zheng X., Contreras M., Dominguez-Bello M. G., Blaser M. J. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*. 2016 Jun 15; 8(343):343ra82. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121. PMID: 27306664; PMCID: PMC5308924.
33. Brandão A., Lavrador C., Fonseca B. M., Correia-da-Silva G., Teixeira N. (2023). The seminal microbiome in health and fertility: A systematic review. *Microorganisms*, 11(7), 1677.
34. Brennan C. A., Garrett W. S. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Mar; 17(3):156–166. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6. PMID: 30546113; PMCID: PMC6589823.
35. Brubaker L. The Female Urinary Microbiota/Microbiome: Clinical and Research Implications / L. Brubaker, A. J. Wolfe // *Rambam Maimonides Med J*. 2017. № 8(2). P. 28. doi: 10.5041/RMMJ.10292.
36. Burton J. H., Johnson M., Johnson J., Hsia D. S., Greenway F. L., Heiman M. L. (2015). Addition of a Gastrointestinal Microbiome Modulator to Metformin Improves Metformin Tolerance and Fasting Glucose Levels. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 9 (4): 808–814. doi: 10.1177/1932296815577425.
37. Campisciano G., Iebba V., Zito G., Luppi S., Martinelli M., Fischer L. et al. *Lactobacillus iners* and *gasseri*, *Prevotella bivia* and HPV Belong to the Microbiological Signature Negatively Affecting Human Reproduction. *Microorganisms*. 2020 Dec 25; 9(1):39. doi: 10.3390/microorganisms9010039.
38. Candelli M., Franza L., Pignataro G., Ojetto V., Covino M., Piccioni A., Gasbarrini A., Franceschi F. Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 10; 22(12):6242. doi: 10.3390/ijms22126242. PMID: 34200555; PMCID: PMC8226948.
39. Cannarella R. et al. (2023). The effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *The World Journal of Men's Health*, 41(1), 1–15.
40. Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature methods*. 2010. T. 7. № 5. P. 335–336.
41. Chen X. et al. (2023) Seminal plasma microbiota in male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*. doi: 10.1111/andr.13456.
42. Claesson M. J., Jeffery I. B., Conde S. et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178-184. doi: 10.1038/nature11319.
43. Clarridge J. E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *ClinMicrobiol Rev*. 2004 Oct; 17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMID: 15489351; PMCID: PMC523561.
44. Copeland C. S. *The World Within Us: Health and the Human Microbiome*. Healthcare Journal of New Orleans, Sept-Oct 2017.

45. Curtiss N. et al. Age, menopausal status and the bladder microbiome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018; 228:126–129. doi: 10.1016/j.ejogrb. 2018.06.011.
46. Da Silva E. Z., Jamur M. C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 2014 Oct; 62(10):698-738. doi: 10.1369/0022155414545334.
47. De Croo I. et al. (2000). Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 15(6), 1383–1388.
48. De Francesco M. A., Negrini R., Ravizzola G., Galli P., Manca N: Bacterial species present in the lower male genital tract: A five-year retrospective study. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 16: 47–53, 2011.
49. Dohle G. R. et al. (2017). EAU guidelines on male infertility. *European Urology*, 48(5), 703–711.
50. Donders G. G., Bosmans E., Dekeersmaeckerb A., Vereecken A., Van Bulck B., Spitz B: Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gyneco* 182: 872-878, 2000; Kovachev S. M: Obstetric and gynecological diseases and complications resulting from vaginal dysbacteriosis 68: 173–184, 2014.
51. Doroftei B., Ilie O. D., Dabuleanu A. M., Hutanu D., Vaduva C. C. A Retrospective Narrative Mini-Review Regarding the Seminal Microbiota in Infertile Male. *Medicina* 2022 Aug 7; 58(8):1067. doi: 10.3390/medicina58081067. PMID: 36013533; PMCID: PMC9414835.
52. Drake M. J., Morris N., Apostolidis A. et al. The urinary microbiome and its contribution to lower urinary tract symptoms; ICI-RS 2015. *Neurourol Urodyn.* 2017 Apr; 36(4):850–853. doi: 10.1002/nau.23006. Review.
53. Duan Y. G., Yu C. F., Novak N., Bieber T., Zhu C. H., Schuppe H. C., Haidl G., Al-lam J. P. Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *Int J Androl.* 2011 Dec; 34(6 Pt 2):e536-45. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01137.x.
54. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization: Amauri J. Paula, Geelsu Hwang, Hyun Koo, *Nat.com*, march 2020 r.; 11 (1): 1354. doi: 10.1038/s41467-020-15165-4.
55. Eini F., Kutenaei M. A., Zareei F. et al. Effect of bacterial infection on sperm quality and DNA fragmentation in subfertile men with Leukocytospermia. *BMC Mol and Cell Biol* 22, 42 (2021). doi: 10.1186/s12860-021-00380-8.
56. Elieh Ali Komi D., Shafaghat F., Haidl G. Significance of mast cells in spermatogenesis, implantation, pregnancy, and abortion: Cross talk and molecular mechanisms. *Am J Reprod Immunol.* 2020 May; 83(5):e13228. doi: 10.1111/aji.13228.
57. Errol C. Friedberg (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer.* 1, 22–33.
58. Esteves S. C. et al. (2021). Male infertility and gonadotropin treatment. *Human Reproduction Update*, 27(6), 1066–1094.
59. European Association of Urology. EAU guidelines on male infertility. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf>. Accessed May 2, 2019.
60. Falony G., Vieira-Silva S., Raes J. (2015). Microbiology Meets Big Data: The Case of Gut Microbiota-Derived Trimethylamine. *Annu. Rev. Microbiol.* 69: 305–321. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104422.

61. Fang Y., Su Y., Xu J., Hu Z., Zhao K., Liu C., Zhang H. Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2021 Aug 31; 12:729539. doi: 10.3389/fimmu.2021.729539. PMID: 34531872; PMCID: PMC8438154.
62. Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J. W., Jayasena C. N., Minhas S. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology.* 2021 Jan; 9(1):115–144. doi: 10.1111/andr.12886. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32794312.
63. Fijak M., Pilatz A., Hedger M. P. et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update.* 2018; 24(4):416–441. doi: 10.1093/humupd/dmy009.
64. Ford A. A., Veit-Rubin N., Cardozo L., Khullar V. Is the microbiome influencing patient care in lower urinary tract dysfunction? Report from the ICI-RS 2017. *NeurourolUrodyn.* 2018 Jun; 37(S4):S93–S98. doi: 10.1002/nau.23708. Review.
65. Fraczek M. et al. (2014). Membrane stability and mitochondrial activity of human spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17751–17768.
66. Francino M. P. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol.* 2016 Jan 12; 6:1543. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543.
67. Gachet C., Prat M., Burucoa C., Grivard P., Pichon M. Spermatogenic Microbiome Characteristics in Infertile Patients: Impact on Sperm Count, Mobility, and Morphology. *J Clin Med.* 2022 Mar 9; 11(6):1505. doi: 10.3390/jcm11061505. PMID: 35329834; PMCID: et al. (2019). The role of varicocele in male infertility: current concepts and future perspectives. *Andrologia*, 51(1), e13189.
68. Gagnière J., Raisch J., Veziant J., Barnich N., Bonnet R., Buc E., Bringer M. A., Pezet D., Bonnet M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 22 (2): 501–518. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.501.
69. Garcia-Segura S., Del Rey J., Closa L., Garcia-Martínez I., Hobeich C., Castel A. B., Vidal F., Benet J., Ribas-Maynou J., Oliver-Bonet M. Seminal Microbiota of Idiopathic Infertile Patients and Its Relationship With Sperm DNA Integrity. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 28; 10:937157. doi: 10.3389/fcell.2022.937157. PMID: 35837328; PMCID: PMC9275566.
70. Garrett W. S. (3 April 2015). Cancer and the microbiota. *Science*. 348 (6230): 80–6. Bibcode: 2015Sci...348...80G. doi: 10.1126/science.aaa4972.
71. Gilbert J. A., Quinn R. A., Debelius J., Xu Z. Z., Morton J., Garg N. et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 2016 Jul 7; 535(7610):94–103. doi: 10.1038/nature18850.
72. Gilbert J. A., Blaser M. J., Caporaso J. G., Jansson J. K., Lynch S. V., Knight R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4), 392–400. doi: 10.1038/nm.4517.
73. Gorelick J. I., Goldstein M. (1993). Loss of fertility in men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 59(3), 613–616.
74. Gu X., Li S. Y., DeFalco T. Immune and vascular contributions to organogenesis of the testis and ovary. *FEBS J.* 2022 May; 289(9):2386–2408. doi: 10.1111/febs.15848.
75. Gupta C., Chinchole A., Shah R., Pathak H., Talreja D., Kayal A. Microscopic varicocelectomy as a treatment option for patients with severe oligospermia. *Investig Clin Urol.* 2018 May; 59(3):182–186. doi: 10.4111/icu.2018.59.3.182. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29744475; PMCID: PMC5934280.

76. H. Cui (2003). Loss of IGF2 Imprinting: A Potential Marker of Colorectal Cancer Risk. *Science*.299, 1753–1755.
77. Haidl G., Duan Y. G., Chen S. J., Kohn F. M., Schuppe H. C., Allam J P. The role of mast cells in male infertility. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Sep; 7(5):627-34. doi: 10.1586/eci.11.57.
78. Honda K., Littman Dan R. (7 July 2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 535 (7610): 75–84. Bibcode: 2016. Natur.535...75H. doi: 10.1038/nature18848.
79. Hotaling J. M., Carrell D. T. (2021). Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*, *9*(2), 595–605. doi: 10.1111/andr.12938.
80. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M. L., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* 2013; 100:1261–1269.
81. Human bacterial repertoire of the urinary tract: a potential paradigm shift / A. Morand [et al.] // *J Clin. Microbiol*. 2018 (Nov 7). pii: JCM.00675-18. doi: 10.1128/JCM.00675-18.
82. Human microbiome project: Diversity of human microbes greater than previously predicted (Science Daily).
83. Hussein M. R., Abou-Deif E. S., Bedaiwy M. A., Said T. M., Mustafa M. G., Nada E., Ezat A., Agarwal A. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril*. 2005, 83, 1447–1453.
84. Hyman R. W. et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in-vitro fertilization embryo transfer. *J. Assist. Repr. Genet*. 2012; 29(2):105–115.
85. Ibishev K. S., Mamedov E. A., Magomedov H. A. The immunological aspects of male infertility: 2016–2020 literature review. *Urology Herald*. 2020; 8(3):97–102. doi: 10.21886/2308-6424-2020-8-3-97-102.
86. Janaina Aderaldo, Diego Teixeira, Mychelle Garcia Torres et al. A Shotgun Metagenomic Mining Approach of Human Semen Microbiome, 16 March 2022, Preprint (Version 1) available at Research Square. doi: 10.21203/rs.3.rs-1220437/v1.
87. Janda J. M., Abbott S. L. (2020). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
88. Javurek A. B., Spollen W. G., Ali A. M., Johnson S. A., Lubahn D. B., Bivens N. J., Bromert K. H., Eilersieck M. R., Givan S. A., Rosenfeld C. S.: Discovery of a novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor alpha genetic status. *Sci Rep* 6: 23027, 2016.
89. Jensen C. F. S. et al. (2022). Varicocele and male infertility: a new meta-analysis and review of the impact of varicocele repair on pregnancy rates. *Current Opinion in Urology*, 32(1), 82–89.
90. Jiménez M., Cervantes-García D., Córdova-Dávalos L. E., Pérez-Rodríguez M. J., Gonzalez-Espinosa C., Salinas E. Responses of Mast Cells to Pathogens: Beneficial and Detrimental Roles. *Front Immunol*. 2021 Jun 15; 12:685865. doi: 10.3389/fimmu.2021.685865.
91. Jovel J., Patterson J., Wang W. et al. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 459. doi: 10.3389/fmicb.2016.00459.
92. Kaur S., Prabha V. Receptor mediated amelioration of the detrimental effects of sperm agglutinating factor on sperm parameters. *Andrology*. 2013 Jul; 1(4):624-31. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00088.x. Epub 2013 May 8. PMID: 23657873.

93. Knez J., Vlaisavljević V. Ženskaneplođnost. In: Takač I., Geršak K., eds. Ginekologija in perinatologija. 1st edn. Maribor: Medicinskafakulteta; 2016. p. 170-9. (in Slovene).
94. Knights D., Lassen K. G., Xavier R. J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*. 2013 Oct; 62(10):1505-10. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303954. PMID: 24037875; PMCID: PMC3822528.
95. 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. *Hum Reprod Update*. 2019 May 1; 25(3):298-325. doi: 10.1093/humupd/dmy048. PMID: 30938752.
96. Koedooder R. et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum Reprod*. 2019 Jun 4; 34(6):1042–1054. doi: 10.1093/humrep/dez065.
97. Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369–384 (2018). doi: 10.1038/s41585-018-0003-3.
98. Kulchenko N. G. Mast cell hyperactivity as the factor in the pathogenesis of male infertility. *Research and Practical Medicine Journal*. 2022; 9(1):117-124. doi: 10.17709/2410-1893-2022-9-1-10.
99. Kutukova N. A., Nazarov P. G. Mast cells: a role in inflammation, tissue repair and fibrosis. *Citokiny i vospalenie*. 2014; 13(2):11–20.
100. La Vignera S., Cannarella R., Condorelli R. A. et al. The Role of the HPG Axis in the Pathogenesis of Male Infertility: The Relationship between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Male Infertility. *J Clin Med*. 2021; 10(8):1776. Published 2021 Apr 20. doi: 10.3390/jcm10081776.
101. Liu C. M., Hungate B. A., Tobian A. A., Ravel J., Prodder J. L., Serwadda D. et al. Penile microbiota and female partner bacterial vaginosis in Rakai, Uganda. *MBio*. 2015 Jun 16; 6 (3): e00589–15.
102. Liubakka A., Vaughn B. P. (2016). *Clostridium difficile* Infection and Fecal Microbiota Transplant. *AACN Advanced Critical Care*. 27 (3): 324–337. doi: 10.4037/aacnacc2016703.
103. Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* 2016; 8:51.
104. Lundy S. D., Sangwan N., Parekh N. V., Selvam M. K. P., Gupta S., McCaffrey P., Bessoff K., Vala A., Agarwal A., Sabanegh E. S., Vij S. C., Eng C. Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. *Eur Urol*. 2021 Jun; 79(6):826–836. doi: 10.1016/j.eururo.2021.01.014.
105. Lundy S. D., Vij SC, Rezk A. H., Cohen J. A., Bajic P., Ramasamy R. The microbiome of the infertile male. *Curr Opin Urol*. 2020 May; 30(3):355–362. doi: 10.1097/MOU.0000000000000742.
106. Magill R. G., MacDonald S. M. Male infertility and the human microbiome. *Front Reprod Health*. 2023 Jun 9; 5:1166201. doi: 10.3389/frph.2023.1166201.
107. Magistro G. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? / G. Magistro, C. G. Stief // *EurUrol Focus*. 2018 (Jul 2). pii: S2405-4569(18)30159-7. doi: 10.1016/j.euf.2018.06.011.
108. Mändar R. et al. (2017) Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*.

109. Manor O., Dai C. L., Kornilov S. A., Smith B., Price N. D., Lovejoy J. C. et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun.* 2020 Oct 15; 11(1):5206. doi: 10.1038/s41467-020-18871-1.
110. Maps Geo-Q. The effect of *Ureaplasma urealyticum* on the level of P34H expression, the activity of hyaluronidase, and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Am J Reprod Immunol.* 2017; 77(1):e12600.
111. Marchesi J. R., Ravel J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 3: 31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5.
112. Marek Jakóbisiak, Witold Lasek, Jakub Gołąb. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters.* 90, 103–122.
113. Mariat D. et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009; 9:123 PMID: 19508720. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.
114. Markle J. G., Frank D. N., Mortin-Toth S., Robertson C. E., Feazel L. M., Rolfe-Kampczyk U., von Bergen M., McCoy K. D., Macpherson A. J., Danska J. S. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013; 339:1084–1088.
115. Mayerhofer A., Walenta L., Mayer C., Eubler K., Welter H. Human testicular peritubular cells, mast cells and testicular inflammation. *Andrologia.* 2018 Dec; 50(11):e13055. doi: 10.1111/and.13055.
116. Meineke V., Frunghieri M. B., Jessberger B., Vogt H., Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: Increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 2000.
117. Mélanie Deschasaux, Kristien E. Bouter, Andrei Prodan, Evgeni Levin, Albert K. Groen, Hilde Herrema, Valentina Tremaroli, Guido J. Bakker, Ilias Attaye, Sara-Joan Pinto-Sietsma, Daniel H. van Raalte, Marieke B. Snijder, Mary Nicolaou, Ron Peters, Aeilko H. Zwinderman, Fredrik Bäckhed and Max Nieuwdorp. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nature Medicine.* Vol 24. October 2018. 1526–1531 // www.nature.com/naturemedicine.
118. Minhas S., Bettocchi C., Boeri L. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol.* 2021; 80(5):603–620. doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014.
119. Molina N. M., Plaza-Díaz J., Vilchez-Vargas R., Sola-Leyva A., Vargas E., Mendoza-Tesarik R., Galán-Lázaro M., Mendoza-Ladrón de Guevara N., Tesarik J., Altmäe S. (2021). Assessing the testicular sperm microbiome: A low-biomass site with abundant contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 43(3), 523–531. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.06.021.
120. Monteiro C. et al. (2018) Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal microbes. *J Reprod Immunol.*
121. Mossadegh-Keller N., Sieweke M. H. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cell Immunol.* 2018 Aug; 330:120–125. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.03.009. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29650243.
122. Moustafa A., Li W., Singh H. et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. *SciRep.* 2018 Mar 12; 8(1):4333. doi: 10.1038/s41598-018-22660-8.
123. Nelson D. E., Van Der Pol B., Dong Q., Revanna K. V., Fan B., Easwaran S. et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate with Asymptomatic Sexually Transmitted Infection *PLoS One.* 2010 Nov 24; 5 (11): e14116.

124. NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. NIH News. 2012. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-human-microbiome-project-defines-normal-bacterial-makeup-body>.
125. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer M. A. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998 Oct; 13(10):2756-61. doi: 10.1093/humrep/13.10.2756. PMID: 9804226.
126. Ogawa T., Dobrinski I., Avarbock M. R., Brinster R. L. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 2000; 6:29–34; Ryu B. Y., Orwig K. E., Oatley J. M., Avarbock M. R., Brinster R. L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24:1505–1511; Zhang X., Ebata K. T., Robaire B., Nagano M. C. Aging of male germ line stem cells in mice. *Biol Reprod* 2006; 74:119–124.
127. O'Hanlon D. E., Come R. A., Moench T. R. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. *BMC Microbiol*. 2019 Jan 14; 19(1):13. doi: 10.1186/s12866-019-1388-8. PMID: 30642259; PMCID: PMC6332693.
128. Oud M. S., Smits R. M., Smith H. E., Mastroianni F. K. Holt G. S., Houston B. J., de Vries P. F., Alobaidi B. K. S., Batty L. E., Ismail H., Zahra N., Zia M., Zia S., Zohaib A., Zaman R., Zaman Q., Zaman M., Zaman M., ... Veltman J. A. (2022). A systematic review and standardized clinical validity assessment of genes involved in female and male infertility. *Human Reproduction Update*, *28*(4), 554–580.
129. Pasolli E., Asnicar F., Manara S., Zolfo M., Karcher N., Armanini F., Beghini F., Manghi P., Tett A., Ghensi P., Collado M. C., Rice B. L., Du Long C., Morgan X. C., Golden C. D., Quince C., Huttenhower C., Segata N. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*. 2019 Jan 24; 176 (3):649–662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.
130. Paul B. Concatenated 16S rRNA sequence analysis improves bacterial taxonomy [version 3; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 2023, 11:1530 doi: 10.12688/f1000research.128320.3.
131. Pearce M.M. et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*. 2014; 5:e01283–14. doi: 10.1128/mBio.01283-14.
132. Pellavio G., Ritta M., Merlo M. et al. Regulation of Androgen Receptor Signaling by MicroRNAs in Human Testicular Germ Cell Tumors. *World J Mens Health*. 2022; 40(2):305-317. doi: 10.5534/wjmh.210118.
133. Penders J., Gerhold K., Stobberingh E. E., Thijs C., Zimmermann K., Lau S., Hamelmann E. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep; 132(3):601-607.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.043. Epub 2013 Jul 27. PMID: 23900058.
134. Pilatz A. et al. (2019). The role of varicocele in male infertility: current concepts and future perspectives. *Andrologia*, 51(1), e13189.
135. Pollock J., Glendinning L., Wisedchanwet T., Watson M. (2018). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus „Best Practice“ for 16S Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02627-17. doi: 10.1128/AEM.02627-17.
136. Porter C. M., Shrestha E., Peiffer L. B., Sfanos K. S. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018 Sep; 21(3):345–354. doi: 10.1038/s41391-018-0041-1. Epub 2018 May 23. Review.

137. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Wang J. A meta-genome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4; 490(7418):55–60. doi: 10.1038/nature11450. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23023125.
138. Quigley E. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (NY)*. 9 (9): 560-9. PMC 3983973. PMID 24729765.
139. Raheem A., Ralph D. Male infertility: causes and investigations. *Trends Urol Men's Health*. 2011; 2(5):8-11. doi: 10.1002/tre.216.
140. Raymond F., Ouameur A. A., Déraspe M., Iqbal N., Gingras H., Dridi B. et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J*. 2016 Mar; 10(3):707-20. doi: 10.1038/ismej.2015.148.
141. Reet Mādar. Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner *Pharmacological Research* Volume 69, Issue 1, March 2013, P. 32–41 doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.019.
142. Rojas C., Gálvez-Jirón F., De Solminihaç J., Padilla C., Cárcamo I., Villalón N., Kurte M., Pino-Lagos K. Crosstalk between Body Microbiota and the Regulation of Immunity. *J Immunol Res*. 2022 May 19; 2022:6274265. doi: 10.1155/2022/6274265. PMID: 35647199; PMCID: PMC9135571.
143. Rothschild D. et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555, 210–215 (2018).
144. Santacroce L., Imbimbo C., Ballini A., Crocetto F., Scacco S., Cantore S., Di Zazzo E., Colella M., Jirillo E. Testicular Immunity and Its Connection with the Microbiota. Physiological and Clinical Implications in the Light of Personalized Medicine. *J Pers Med*. 2022 Aug 20; 12(8):1335. doi: 10.3390/jpm12081335.
145. Schlegel P. N. (1999). Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 14:131–135.
146. Schlegel P. N., Sigman M., Collura B., De Jonge C. J., Eisenberg M. L., Lamb D. J., Mulhall J. P., Niederberger C., Sandlow J. I., Sokol R. Z., Spandorfer S. D., Tanrikut C., Treadwell J. R., Oristaglio J. T., Zini A. (2021). Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. Fertility and Sterility, *115*(1), 54–61. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.015.
147. Schlegel P. N., Shin D. (2013). Sperm retrieval techniques. *Nature Reviews Urology*, 10(12), 723–730.
148. Schmid N., Stöckl J. B., Flenkenthaler F., Dietrich K. G., Schwarzer J. U., Köhn F. M., Drummer C., Fröhlich T., Arnold G. J., Behr R., Mayerhofer A. Characterization of a non-human primate model for the study of testicular peritubular cells-comparison with human testicular peritubular cells. *Mol Hum Reprod*. 2018 Aug 1; 24(8):401–410. doi: 10.1093/molehr/gay025.
149. Schoenmakers S., Steegers-Theunissen R., Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet Med*. 2019 Sep; 12(3):107–115. doi: 10.1177/1753495X18775899. Epub 2018 May 17. PMID: 31523266; PMCID: PMC6734629.
150. Schroeder B. O., Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med*. 22, 1079–1089 (2016).
151. Lynch S. V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med*. 375, 2369–2379 (2016).

152. Scott W. Lowe, Athena W. Lin. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21, 485–495.
153. Sender R., Fuchs S., Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016; 164 (3): 337-40. PMID: 26824647. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.
154. Shade A., Handelsman J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.
155. Sherwood Linda; Willey Joanne; Woolverton Christopher (2013). *Prescott's Microbiology* (9th ed.). New York: McGraw Hill. pp. 713–721. ISBN 9780073402406. OCLC 886600661.
156. Shin N. R., Whon T. W., Bae J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol* 2015; 33:496–503.
157. Shoskes D. A., Altemus J., Polackwich A. S. et al. The Urinary Microbiome Differs Significantly Between Patients With Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome and Controls as Well as Between Patients 32. doi: 10.1016/j.urology.2016.02.043.
158. Simon J. C., Marchesi J. R., Mougél C., Selosse M. A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*. 2019 Jan 11; 7(1):5. doi: 10.1186/s40168-019-0619-4.
159. Sirota I., Zarek S. M., Segars J. H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med*. 2014 Jan; 32(1):35–42. doi: 10.1055/s-0033-1361821. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24390919; PMCID: PMC4137456.
160. Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M., Benyamin F. W., Lei Y. M., Jabri B., Alegre M. L. et al: Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 350: 1084–1089, 2015.
161. Skonieczna-Żydecka K. et al. A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression Evaluating the Efficacy and Mechanisms of Action of Probiotic and Synbiotic in the Prevention of Surgical Site Infection and Surgery-Related Complications. *J ClinMed*. 2018; 7(12):pii:E556. doi: 10.3390/jcm7120556.
162. Soboleva M., Nikityuk D., Alexeeva N., Klochkova S., Atyakshin D., Gerasimova O., Sokolov D., Kvaratskheliya A. Features of histotopography of skin mast cells when simulating a burn under conditions of using various methods of regional exposure. *Genes & Cells*. 2021; 16(1):69–74. doi: 10.23868/202104011.
163. Stronks K. et al. Unravelling the impact of ethnicity on health in Europe: the HELIUS study. *BMC Public Health* 13, 402 (2013).
164. Snijder M. B. et al. Cohort profile: the Healthy Life in an Urban Setting (HELIUS) study in Amsterdam, The Netherlands. *BMJ Open* 7, e017873 (2017), (HELIUS).
165. Tang J. Microbiome in the urinary system-a review. *AIMS Microbiol*. 2017 Mar 20; 3(2):143–154. doi: 10.3934/microbiol.2017.2.143.
166. Tharakan T., Luo R., Jayasena C. N., Minhas S. Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Fac Rev*. 2021 Jan 26; 10:7. doi: 10.12703/r/10-7. PMID: 33659925; PMCID: PMC7894261.
167. Toh E., Xing Y., Gao X., Jordan S. J., Batteiger T. A., Batteiger B. E., Van Der Pol B., Muzny C. A., Gebregziabher N., Williams J. A., Fortenberry L. J., Fortenberry J. D., Dong Q., Nelson D. E. Sexual behavior shapes male genitourinary microbiome composition. *Cell Rep Med*. 2023 Mar 21; 4(3):100981. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.100981. PMID: 36948151; PMCID: PMC10040456.

168. Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput*. 2020 Apr 13; 9(2):10. doi: 10.3390/ht9020010.
169. Tüttelmann F. et al. (2011). Gene polymorphisms and male infertility — a meta-analysis and literature review. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(6), 643–658.
170. Tvrdá E., Lovíšek D., Gálová E., Schwarzová M., Kováčiková E., Kunová S., Žiarovská J., Kačániová M. Possible Implications of Bacteriospermia on the Sperm Quality, Oxidative Characteristics, and Seminal Cytokine Network in Normozoospermic Men. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 4; 23(15):8678. doi: 10.3390/ijms23158678. PMID: 35955814; PMCID: PMC9369207.
171. Varricchi G., de Paulis A., Marone G., Galli S. J. Future Needs in Mast Cell Biology. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 6; 20(18):4397. doi: 10.3390/ijms20184397.
172. Veneruso I., Cariati F., Alviggi C. et al. Metagenomics Reveals Specific Microbial Features in Males with Semen Alterations. *Genes (Basel)*. 2023 Jun 6; 14(6):1228. doi: 10.3390/genes14061228.
173. Ventimiglia E. et al. Extensive Assessment of Underlying Etiological Factors in Primary Infertile Men Reduces the Proportion of Men with Idiopathic Infertility. *Front Endocrinol*. 2021; 12. doi: 10.3389/fendo.2021.801125.
174. Ventimiglia E., Montorsi F., Salonia A. Comorbidities and male infertility: a worrisome picture. *Curr Opin Urol* 2016; 26:146–151.
175. Vetrovsky T., Baldrian P. (2013) The Variability of the 16s rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS One*, 8. doi: 10.1371/journal.pone.0057923.
176. Villegas J., Schulz M., Soto L., Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis*. 2005 Jan; 10(1):105-10. doi: 10.1007/s10495-005-6065-8. PMID: 15711926.
177. Visconti A., Le Roy C. I., Rosa F., Rossi N., Martin T. C., Mohny R. P., Li W., de Rinaldis E., Bell J. T., Venter J. C., Nelson K. E., Spector T. D., Falchi M. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nat Commun*. 2019 Oct 3; 10(1):4505. doi: 10.1038/s41467-019-12476-z. PMID: 31582752; PMCID: PMC6776654.
178. Weidner W., Pilatz A., Diemer T., Schuppe H. C. (2020) Male genital tract inflammation and sperm quality. In: Parekattil S., Agarwal A. (eds) *Male Infertility*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-32300-4_32.
179. Welter H., Huber A., Lauf S., Einwang D., Mayer C., Schwarzer J. U., Mayerhofer A. (2014). Angiotensin II regulates testicular peritubular cell function via AT1 receptor: A specific situation in male infertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2), 171–178. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.011.
180. 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 Oct 23; 9(10):e110152. doi: 10.1371/journal.pone.0110152.
181. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition. Geneva: World Health Organization; 2021.
182. Wolf M., Müller T., Dandekar T., Pollack J. D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 871–875, 2004. 29.

183. Yang H., Zhang J., Xue Z., Zhao C., Lei L., Wen Y., Dong Y., Yang J., Zhang L. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermia. *Sci Rep.* 2020 Apr 23; 10(1):6876. doi: 10.1038/s41598-020-63787-x.
184. Yatsunenko T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R. N., Anokhin A. P., Heath A. C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J. G., Lozupone C. A., Lauber C., Clemente J. C., Knights D., Knight R., Gordon J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012 May 9; 486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053. PMID: 22699611; PMCID: PMC3376388.
185. Yi-chao X. U., Jing L. I., Liang W.-B., Zhu W.-J. Evaluation on changes of testicular histology in aging men. *J Reprod Contracept* 2014; 24:199–204.
186. Younes J.A., Lievens E., Hummelen R., van der Westen R., Reid G., Petrova M. I. Women and their microbes: The unexpected friendship. *Trends Microbiol* 26: 16–32, 2018.
187. Zampini A., Nguyen A. H., Rose E., Monga M., Miller A. W. Defining Dysbiosis in Patients with Urolithiasis. *SciRep.* 2019 Apr 1; 9(1):5425. doi: 10.1038/s41598-019-41977-6. PMID: 30932002.
188. Zhang X., Deng C., Liu W., Liu H., Zhou Y., Li Q., Zheng H., Wang Q., Jiang M., Pang T., Ma C., Huang C., Zhao Q., Tang Y. Effects of varicocele and microsurgical varicocelectomy on the metabolites in semen. *Sci Rep.* 2022 Mar 25; 12(1):5179. doi: 10.1038/s41598-022-08954-y. PMID: 35338186; PMCID: PMC8956711.
189. Zhang J., Huang Y., Wang X. et al. (2021). Age-related changes in the testicular microbiome and their association with spermatogenic dysfunction in mice. *Aging Cell*, 20(6), e13373. doi: 10.1111/accel.13373.
190. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014 Sep; 11(5):428-37. doi: 10.1038/cmi.2014.38.
191. Zhernakova A. et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 352, 565–569 (2016);
192. Falony G. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352, 560–564 (2016);
193. Goodrich J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799 (2014).
194. Zozaya M., Ferris M. J., Siren J. D., Lillis R., Myers L., Nsuami M. J., Eren A. M., Brown J., Taylor C. M., Martin D. H. Microbiome. 2016 Apr 19; 4:16. doi: 10.1186/s40168-016-0161-6. PMID: 27090518; PMCID: PMC4835890.
195. Zuber A., Peric A., Pluchino N., Baud D., Stojanov M. Human Male Genital Tract Microbiota. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 8; 24(8):6939. doi: 10.3390/ijms24086939.