

МИКРОБИОТА ЭЯКУЛЯТА У ПАЦИЕНТОВ С НОРМОЗООСПЕРМИЕЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Е. С. Ворошилина^{1,2}✉, Д. Л. Зорников¹, А. В. Иванов^{3,4}, Д. Г. Почерников⁵, Е. А. Паначева^{1,2}

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

⁴ Институт математики и механики имени Н. Н. Красовского, Екатеринбург, Россия

⁵ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

Оценка микробиоты эякулята осложнена из-за отсутствия четких критериев для интерпретации микробиологических тестов. Целью работы было определить устойчивые варианты микробиоты, исследованной методом ПЦР-РВ, в образцах эякулята с нормозооспермией. В исследование включили 227 проб эякулята, отвечающих критериям нормозооспермии. В 107 (41,7%) образцах фиксировали наличие суммарной бактериальной ДНК и хотя бы одной из исследованных групп микроорганизмов в значениях не менее 10^3 ГЭ/мл. В данных образцах выделили четыре устойчивых кластера микробиоты, характеризующихся преобладанием определенной группы микроорганизмов: облигатных анаэробов (кластер 1; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 81,1%), *Lactobacillus spp.* (кластер 2; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 64,3%) грамположительных факультативных анаэробов (кластер 3; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 92,5%), *Enterobacteriaceae/Enterococcus* (кластер 4; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 80,8%). Кластеры ранжированы по частоте встречаемости: кластер 1 (43 (40,2%)), кластер 3 (27 (25,2%)), кластер 2 (22 (20,6%)), кластер 4 (15 (14,0%)).

Ключевые слова: микробиота эякулята, ПЦР-РВ, кластерный анализ, спермограмма, нормозооспермия

Благодарности: авторы благодарят директора медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург) В. Н. Хаютина за возможность выполнения исследования на базе центра.

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — планирование эксперимента, проведение ПЦР-РВ, анализ данных, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ литературы, анализ данных, написание статьи; А. В. Иванов — статистическая обработка, кластерный анализ, написание статьи; Д. Г. Почерников — отбор пациентов, написание статьи; Е. А. Паначева — отбор пациентов, выполнение спермограмм и ПЦР-РВ, анализ литературы, анализ данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 20 сентября 2019 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Репина, д. 3, г. Екатеринбург, 620028, Россия; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 16.09.2021 **Статья принята к печати:** 06.10.2021 **Опубликована онлайн:** 28.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.048

MICROBIOTA OF SEMEN SAMPLES WITH NORMOZOOSPERMIA: ANALYSIS OF REAL-TIME PCR DATA

Voroshilina ES^{1,2}✉, Zornikov DL¹, Ivanov AV^{3,4}, Pochernikov DG⁵, Panacheva EA^{1,2}

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

³ Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

⁴ Institute of Mathematics and Mechanics, Yekaterinburg, Russia

⁵ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia

The analysis of semen microbiota is difficult due to the lack of established criteria for interpretation of microbiological tests. The aim of the study was to determine the stable clusters of semen microbiota analyzed by real-time PCR in samples with normozoospermia. Semen samples of 227 men with normal spermograms were included in the study. The quantity of total bacterial DNA and at least one group of microorganisms was more than 10^3 GE/ml in 107 (41.7%) samples. Four stable microbiota clusters with the prevalence of a specific microorganism group were distinguished in these samples: obligate anaerobes (OA) cluster (proportion in the centroid — 81.1%); *Lactobacillus spp.* cluster (proportion in the centroid — 64.3%); gram-positive facultative anaerobes (GPFA) cluster (proportion in the centroid — 92.5%); *Enterobacteriaceae/Enterococcus* (EE) cluster (proportion in the centroid — 80.8%). The clusters were ranked by frequency of occurrence: OA cluster was the most prevalent (43 (40.2%) of 107), second-most frequent were GPFA-cluster (27 (25.2%)) and *Lactobacillus*-cluster (22 (20.6%)). EE-dominated cluster was found in 15 (14.0%) cases.

Keywords: semen microbiota, real-time PCR, cluster analysis, semen analysis, normozoospermia

Acknowledgments: the authors would like to thank VN Khayutin, director of "Garmonia" Medical Center, for allowing them to conduct the study in the clinic's laboratory department.

Author contribution: Voroshilina ES — organization of the study, data analysis, writing the article; Zornikov DL — data analysis, writing the article; Ivanov AV — statistical processing, data analysis, writing the article; Pochernikov DG — patient selection, writing the article; Panacheva EA — literature review, data analysis, patient selection, conducting semen analyses and PCR tests, writing the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol № 7 dated September 20, 2019). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Voroshilina
Repina, 3, Yekaterinburg, 620014, Russia; voroshilina@gmail.com

Received: 16.09.2021 **Accepted:** 06.10.2021 **Published online:** 28.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.048

Микробиота эякулята остается малоисследованной частью микробиома человека, несмотря на серьезный интерес к данному биоматериалу в контексте борьбы с бесплодием и возможности современных молекулярных технологий [1]. Мужской фактор является причиной бесплодия у половины пар [2], однако причина infertilityности у мужчин часто остается неустановленной [3]. Наличием инфекции удается объяснить до 6–10% случаев мужского бесплодия [4]. Было показано, что некоторые бактерии могут оказывать прямое повреждающее действие на сперматозоиды, снижая их подвижность и жизнеспособность [5].

Использование молекулярно-генетических методов, прежде всего NGS, позволило установить присутствие сложных бактериальных сообществ не только в эякуляте пациентов с инфекционно-воспалительными процессами, но и у здоровых мужчин с нормозооспермией [1, 6–10]. Часть обнаруживаемых микроорганизмов (МО) являлись трудно- или некультивируемыми (включая облигатно анаэробных бактерий) [8, 10, 11], чем можно объяснить получение большего количества положительных образцов, чем при использовании культурального исследования. Однако обнаружение МО в семенной жидкости пациентов с нормозооспермией заставило отказаться от представлений о бактериоспермии как маркере исключительно патологического состояния [6, 7, 9]. Вместо этого были выдвинуты осторожные предположения о наличии взаимосвязи состава микробиоты эякулята и отклонений в спермограмме [6, 9].

Результаты немногочисленных исследований микробиоты эякулята от пациентов с нормозооспермией были получены на ограниченном числе образцов, что не позволило сформулировать четкие представления о норме для данного биологического материала [1]. Кроме того, использованный в этих исследованиях метод NGS-секвенирования имеет ряд объективных недостатков, препятствующих его внедрению в практическое здравоохранение: высокую стоимость и трудоемкость, сложность стандартизации процедуры и интерпретации полученных результатов.

С практической точки зрения более перспективен для рутинного исследования микробиоты эякулята другой молекулярно-генетический метод — ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ). Появление зарегистрированного теста для оценки микробиоты урогенитального тракта у мужчин открыло новые возможности для выявления в эякуляте широкого спектра патогенных и условно-патогенных МО, включая трудно и некультивируемые бактерии, а также *Lactobacillus spp.* [12, 13], которые традиционно считают обитателями женского репродуктивного тракта. Доступность этого инструмента ставит вопрос о корректной интерпретации полученных с его помощью результатов. Присутствие множества групп бактерий в различных комбинациях и количествах потребовало обращения к методам математического моделирования для выявления закономерностей формирования микробиоты эякулята. Применение кластерного анализа позволило свести все многообразие выявленных сочетаний МО к четырем устойчивым типам микробных сообществ, отличающихся преобладанием разных групп бактерий [12]. Для понимания клинической значимости обнаружения различных вариантов микробиоты необходим анализ частоты их выявления и особенностей микробного состава в образцах, соответствующих критериям нормозооспермии и имеющим признаки патологии.

Целью исследования стало определение устойчивых вариантов микробиоты, исследованной методом ПЦР-РВ, в образцах эякулята с нормозооспермией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы обследованных пациентов

В исследование включили 227 образцов эякулята с нормозооспермией, полученные от мужчин (возраст — 20–59, средний возраст — $33 \pm 4,7$ года), которые в период с января 2019 г. по март 2020 г. обратились в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург, $n = 142$) и урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии (г. Иваново, $n = 85$) для прегравидарной подготовки.

Критерии включения пациентов в исследование: отсутствие приема антибактериальных и гормональных препаратов в течение последних четырех недель, нормозооспермия по результатам исследования спермограмм.

Критерии исключения из исследования: наличие гипо- и гипергонадотропного гипогонадизма, сахарного диабета 1-го и 2-го типов, гипо- и гипертиреоза; наличие инфекций, передающихся половым путем (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*); клинические проявления простатита; наличие аномалий кариотипа, мутаций в гене *CFTR*, микроделеций в AZF-локусе Y-хромосомы.

У всех пациентов были получены образцы эякулята в соответствии с ниже описанными правилами, проведена оценка параметров спермограммы и состава микробиоты эякулята.

Техника получения эякулята

Подготовку пациентов и отбор материала проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по сбору эякулята для микробиологических исследований (пункт 2.2.4 Руководства ВОЗ). Обязательным условием было половое воздержание в течение 2–5 дней. Сбор эякулята осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер после предварительного мочеиспускания и туалета наружных половых органов [14].

Оценка параметров спермограммы

Анализ эякулята проводили после 30–60-минутного разжижения материала, подсчет количества (концентрации) и подвижности сперматозоидов — с помощью сперманализатора Biola SCA («Биола»; Россия). Морфологию сперматозоидов оценивали в окрашенных препаратах при увеличении микроскопа $\times 1000$ с помощью диагностического набора «Spermac Stain» (Ferti Pro; Бельгия).

Полученные данные интерпретировали в соответствии с критериями ВОЗ [14].

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛЮС («ДНК-Технология»; Россия). Образцы эякулята подвергали предварительной обработке по следующей методике: 1,0 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1,0 мл транспортной среды («Транспортная среда с муколитиком»; «ИнтерЛабСервис», Россия), встряхивали

на приборе «Vortex» до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге Mini-Spin (Eppendorf; Германия). После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК.

Оценка микробиоты эякулята

Исследование проводили с использованием набора реагентов «Андрофлор» в детектирующем амплификаторе ДТпрайм (все производства «ДНК-Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения проводили автоматический расчет количества общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл и каждого из условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в представленном образце (выражали в геном-эквивалентах на мл (ГЭ/мл)). Спектр МО, определяемых набором, представлен следующими группами: грамположительные факультативно-анаэробные МО (*Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*); грамотрицательные факультативно-анаэробные МО (*Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.*); группа *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus spp.*; облигатно-анаэробные микроорганизмы (*Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*, *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.*, *Atopobium cluster*); микоплазмы (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*); группа *Lactobacillus spp.*; грибы рода *Candida*.

В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) использовали стерильную деионизированную воду. В ОКО положительные сигналы по некоторым группам МО в ПЦР-РВ фиксировали не ранее 35 цикла амплификации (что соответствовало микробной нагрузке менее 10^3 ГЭ/мл). На основании этого значимым считали количество МО не менее 10^3 ГЭ/мл, что соответствовало положительному сигналу в ПЦР-РВ до 35 цикла. Исключение составляли *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в ОКО отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам МО расценивали как положительный. Грибы рода *Candida* в данном исследовании не учитывали.

Статистические методы

Анализ структурных особенностей микробиоты эякулята проводили с использованием модели кластеризации MSSC, минимизирующей сумму по всем кластерам внутрикластерных сумм квадратов расстояний от элементов кластеров до их центроидов [15]. Решение задачи кластеризации проводили с использованием алгоритма *k-means++* [16], реализованного в библиотеке машинного обучения *scikit-learn*. Выбор оптимальной кластеризации проводили на основе внутренних оценок качества кластеризации: индекса силуэта [17] и индекса Дэвиса–Болдина [18].

Для запуска алгоритма кластеризации *k-means++* каждый исследуемый образец был представлен в виде вектора $(p, s) \in R^{50}$ состоящего из вектора первичных признаков $p \in R^{19}$, взятых из данных исследований микробиоты эякулята методом ПЦР-РВ, и вектора

вторичных признаков $s \in R^{31}$, рассчитываемых на основе первичных признаков.

Первичными признаками являлись абсолютные значения показателя, определяемых тестом Андрофлор (ОБМ и 18 групп МО).

На основе первичных признаков рассчитывали следующие вторичные признаки: скорректированную ОБМ (СОБМ), равную суммарной массе 18 определяемых групп МО; массовые доли МО по отношению к СОБМ; массы укрупненных в соответствии с компоновкой теста Андрофлор групп МО: *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов (ГПФА), облигатных анаэробов (ОА), грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА), *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* (ЕЕ) и микоплазм; массовые доли укрупненных групп МО по отношению к СОБМ.

Для оптимальной кластеризации исследовали устойчивость кластеров к изменению размера выборки. С этой целью кластеризовали случайные подвыборки объемом от 1 до 100% от исходной выборки и рассчитывали индекс устойчивости кластеров по следующей формуле:

$$Stability\ Index(k) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{true\}}([A(x_i), A(x_j) \in k] \wedge [\exists l A'(x_i), A'(x_j) \in l])}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{true\}}([A(x_i), A(x_j) \in k]) \cdot \mathbf{1}_{\{true, false\}}([\exists l A'(x_i), A'(x_j) \in l])},$$

где $\mathbf{1}_{\{true\}}$: $\{true, false\} \rightarrow \{0, 1\}$ — индикаторная функция логического аргумента; $A(x)$, $A'(x)$ — метка кластера наблюдения x , полученного в результате кластеризации на основе исходного набора данных и подвыборки, соответственно; $k = \{1, 2, 3, 4\}$, $l = \{1, 2, 3, 4\}$ — метки кластеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальная ДНК (ОБМ) отсутствовала или определена в количестве менее 10^3 ГЭ/мл в 81 (35,7%) образце эякулята. В 39 (17,1%) образцах ОБМ составила более 10^3 ГЭ/мл, однако число всех определяемых групп МО было ниже установленного порога.

В 107 (47,1%) из 227 образцах ОБМ составляла не менее 10^3 ГЭ/мл (медиана — $10^{3,8}$, межквартильный размах — $10^{3,5}$ – $10^{4,4}$ ГЭ/мл) и одновременно выявлено от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях. Частота встречаемости отдельных групп МО в надпороговых значениях представлена в табл. 1.

Разные группы МО присутствовали во множестве ассоциаций друг с другом. Поэтому было принято решение провести кластерный анализ с целью определения характерных для эякулята микробных сообществ.

Кластерный анализ микробиоты эякулята

Для проведения кластерного анализа отобрали 107 проб, отвечающие следующим критериям: ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл, как минимум одна группа МО не менее 10^3 ГЭ/мл.

Определение оптимального количества кластеров в исследуемом наборе данных проводили на основе значений индексов силуэта и Дэвиса–Болдина (табл. 2). Наилучшему качеству кластеризации соответствуют наибольшее значение индекса силуэта и наименьшее значение индекса Дэвиса–Болдина. В соответствии с полученными значениями индексов оптимальным было выделение 4, 9 или 10 кластеров. Однако при проверке устойчивости кластеры, полученные в результате 9- и 10-кластеризации, демонстрировали меньшую устойчивость в сравнении с таковыми, полученными в результате 4-кластеризации.

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп МО в надпороговых значениях ($n = 227$)*

Группы микроорганизмов	n	%
<i>Corynebacterium spp.</i>	39	17,2
<i>Streptococcus spp.</i>	30	13,2
<i>Bacteroides spp. / Porphyromonas spp. / Prevotella spp.</i>	28	12,3
<i>Peptostreptococcus spp. / Parvimonas spp.</i>	28	12,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	26	11,5
<i>Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.</i>	24	10,6
<i>Eubacterium spp.</i>	22	9,7
<i>Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp.</i>	22	9,7
<i>Ureaplasma parvum</i>	20	8,8
<i>Atopobium cluster</i>	18	7,9
<i>Gardnerella vaginalis</i>	17	7,5
<i>Staphylococcus spp.</i>	17	7,5
<i>Sneathia spp. / Leptotrichia spp. / Fusobacterium spp.</i>	13	5,7
<i>Haemophilus spp.</i>	12	5,3
<i>Anaerococcus spp.</i>	10	4,4
<i>Mycoplasma hominis</i>	10	4,4
<i>Pseudomonas aeruginosa / Ralstonia spp. / Burkholderia spp.</i>	8	3,5
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	8	3,5

Примечание: * — для групп *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* надпороговые значения > 0 , для остальных групп МО $\geq 10^9$ ГЭ/мл.

На основании этого было принято решение выделять 4 основных кластера микробиоты эякулята.

Каждый из полученных кластеров отличался преобладанием определенной укрупненной группы МО. На рис. 1 представлены диаграммы размаха признаков объектов, попавших в соответствующий кластер.

Кластер 1 — вариант с преобладанием ОА. СОБМ составила $10^{4,3}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество всех ОА было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{4,2}$ ГЭ/мл (рис. 1А). Доля ОА в центроиде достигала 81,1% относительно СОБМ. Выделить преобладающую группу ОА из числа определяемых с помощью теста не удалось: как правило, в образцах присутствовало сразу несколько групп ОА одновременно. Данный вариант микробиоты определили в 43 (40,2%) из 107 образцов.

Кластер 2 — вариант с преобладанием *Lactobacillus spp.*, выявили в 22 (20,6%) из 107 образцов. СОБМ составила $10^{4,0}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество *Lactobacillus spp.* было ниже количества СОБМ и в центроиде и составило $10^{3,5}$ ГЭ/мл (рис. 1Б). Доля *Lactobacillus spp.* в центроиде — 64,3% относительно СОБМ. Одновременно с *Lactobacillus spp.* присутствовали представители ОА, ГПФА и ГОФА.

Таблица 2. Значения показателей качества кластеризации при разном числе кластеров

Число кластеров	Индекс силуэта	Индекс Дэвиса–Болдина
2	0,19	1,68
3	0,25	1,73
4	0,32	1,30
5	0,30	1,42
6	0,32	1,34
7	0,32	1,27
8	0,32	1,28
9	0,34	1,17
10	0,34	1,24

Кластер 3 — вариант с преобладанием ГПФА. СОБМ составила $10^{3,7}$ ГЭ/мл в центроиде. В образцах, отнесенных к данному кластеру, абсолютное количество ГПФА было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{3,7}$ ГЭ/мл (рис. 1В). Доля ГПФА в центроиде достигала 92,5% относительно СОБМ. Данный кластер у пациентов с нормозооспермией чаще формировался вокруг *Corynebacterium spp.* и *Streptococcus spp.* Этот вариант микробиоты эякулята идентифицировали в 27 (25,2%) из 107 образцов.

Кластер 4 — вариант с преобладанием группы ЕЕ. СОБМ составила $10^{4,2}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество всех ЕЕ было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{4,1}$ ГЭ/мл (рис. 1Г). Доля ЕЕ в центроиде — 80,8% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята определили в 15 (14,0%) из 107 образцов.

Анализ устойчивости микробных кластеров

Для исследования устойчивости выделенных кластеров генерировали подвыборки объемом 1–100% от исходной выборки (1000 случайных подвыборок без возврата на каждое значение объема).

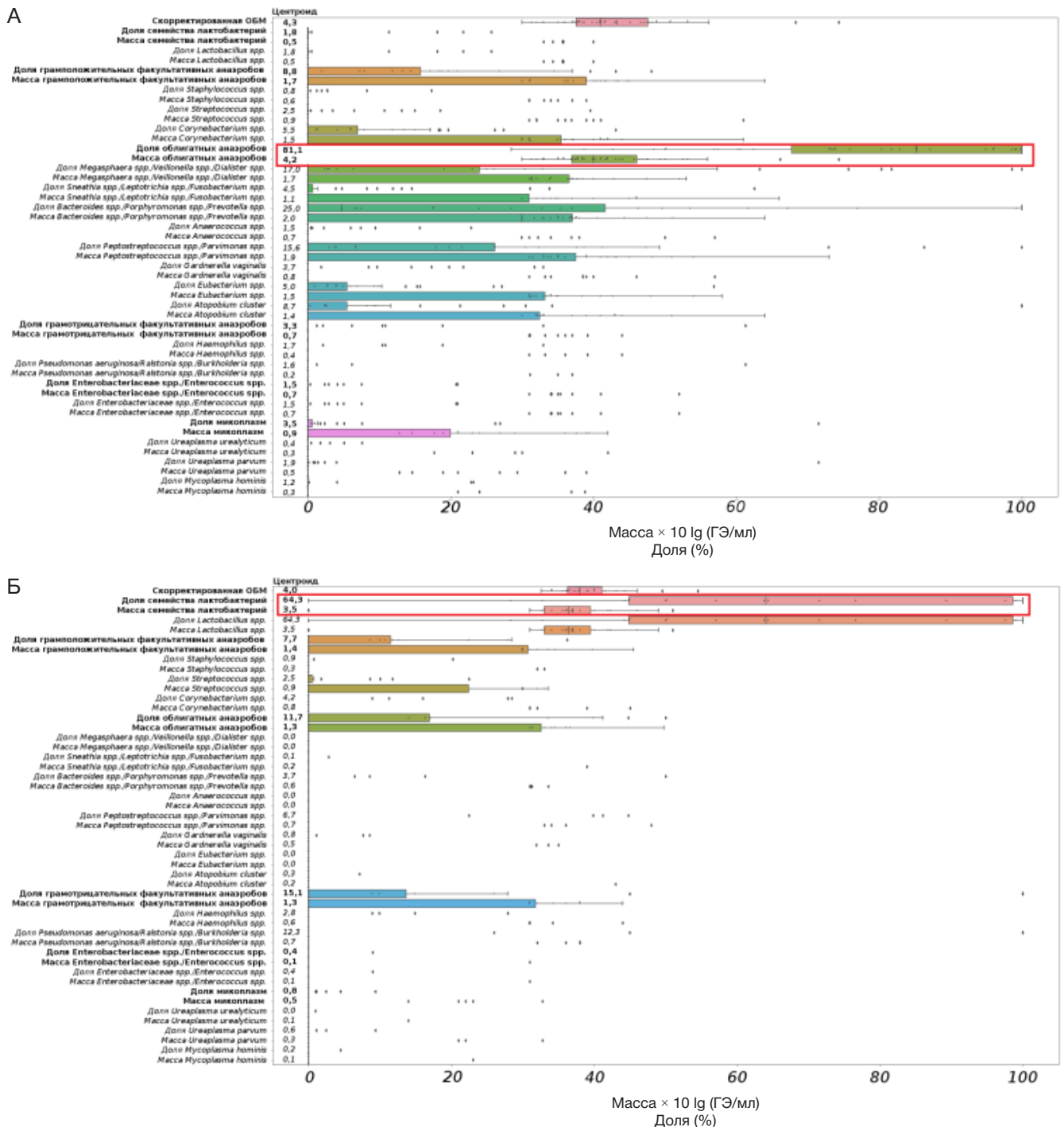


Рис. 1. Результаты кластерного анализа микробиоты эякулята, исследованного методом ПЦР-РВ ($n = 107$). По оси ординат представлены значения признаков в центриоде. Красными прямоугольниками обведены диаграммы размаха преобладающих групп микроорганизмов. Для кластера 1 ($n = 43$) характерно преобладание облигатных анаэробов (А), для кластера 2 ($n = 22$) — *Lactobacillus* spp. (Б), для кластера 3 ($n = 27$) — грамположительных факультативных анаэробов (В), для кластера 4 ($n = 15$) — *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. (Г)

На рис. 2 представлены графики устойчивости кластеров, полученных на основе 4-кластеризации микробиоты образцов эякулята, соответствовавших критериям нормозооспермии. Наиболее устойчивыми оказались кластеры с преобладанием ГПФА (кластер 3; рис. 2В) и преобладанием ЕЕ (кластер 4; рис. 2Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования микробную ДНК в надпороговых значениях (не менее 10^3 ГЭ/мл) обнаружили в 146 (64,3%) из 227 образцов эякулята, отвечающих

критериям нормозооспермии. В 81 (35,7%) образце бактериальная ДНК отсутствовала или определялась в количестве менее 10^3 ГЭ/мл и вполне могла быть китомной ДНК (микробной ДНК, присутствующей в наборах реагентов) [19]. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, отмечавших присутствие МО в эякуляте мужчин с нормальными показателями спермограммы [1, 6–8, 20]. В 107 (47,1%) пробах с ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл обнаружили до 14 групп МО в надпороговых значениях, что тоже согласуется с ранее полученными данными о наличии в семенной жидкости здоровых мужчин полимикробных ассоциаций [1, 8, 20].

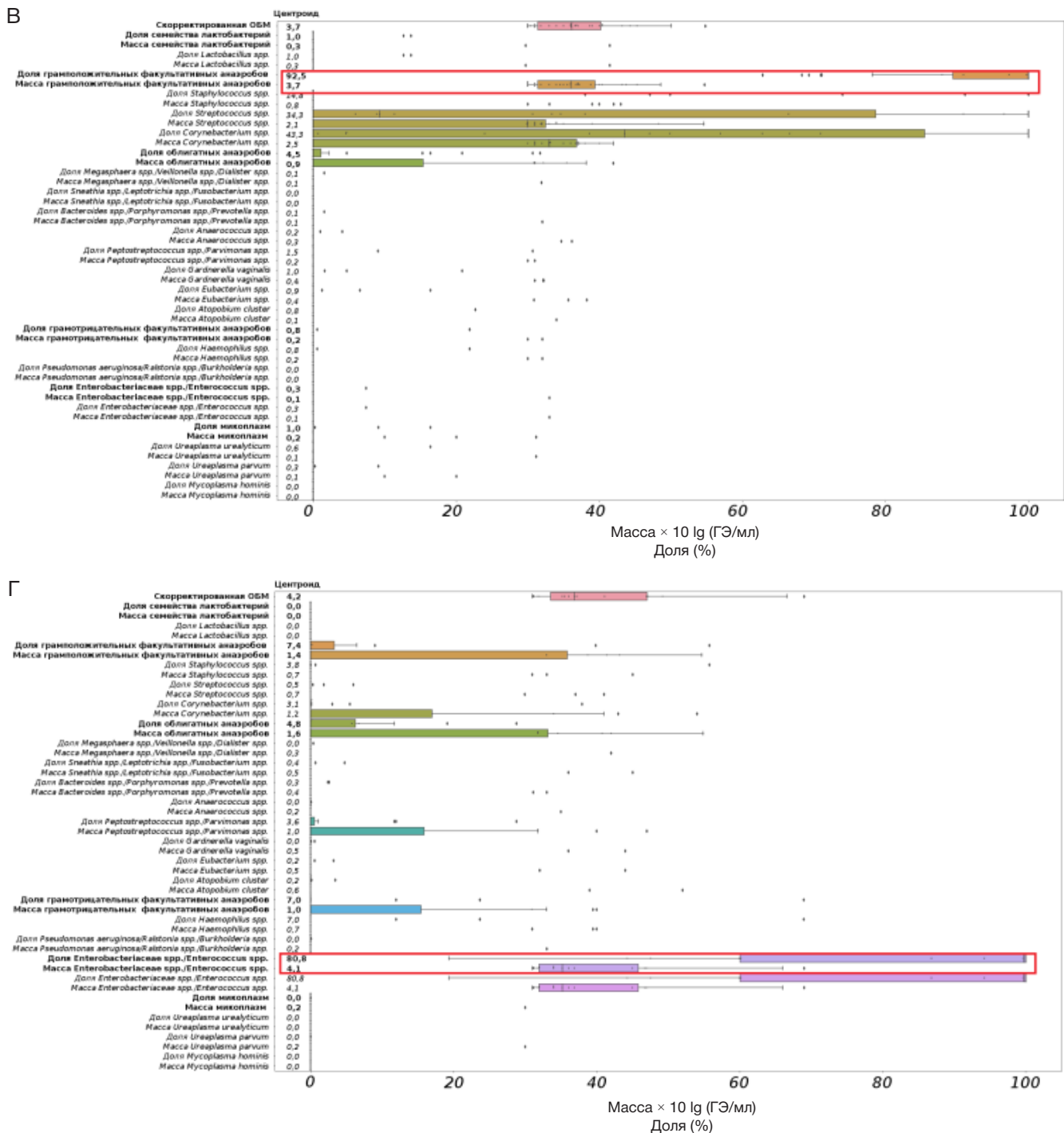


Рис. 1. (продолжение)

Бактерии рода *Corynebacterium* идентифицировали в 17,2% исследованных образцов — чаще, чем остальные группы МО. *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp., *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. присутствовали в 10,6–13,2% проб. Остальные исследованные группы МО были обнаружены в 3,5–9,7% проб. Одновременное выявление множества групп МО в различных сочетаниях делает невозможным интерпретацию полученных результатов без применения дополнительного математического анализа.

Положительные образцы в зависимости от преобладающей группы МО были сгруппированы в четыре кластера, аналогичные полученным при исследовании

всех типов эякулята [21]: варианты с преобладанием ОА, *Lactobacillus* spp., ГПФА, ЕЕ. При этом последние два кластера более устойчивы, чем первые два. Примечательно, что выделенные исключительно математически кластеры образованы МО со схожими физиологическими свойствами. В частности три из четырех выделенных кластеров (с преобладанием ОА, ГПФА, ЕЕ) сформированы филогенетически гетерогенными МО с одинаковой потребностью в кислороде, что также было отмечено в других исследованиях [1]. По всей видимости, данный феномен обусловлен наличием различных экологических ниш для колонизирующих эякулят МО, что неудивительно, поскольку эякулят представляет собой смесь биоматериалов из разных отделов уrogenитального тракта [6].

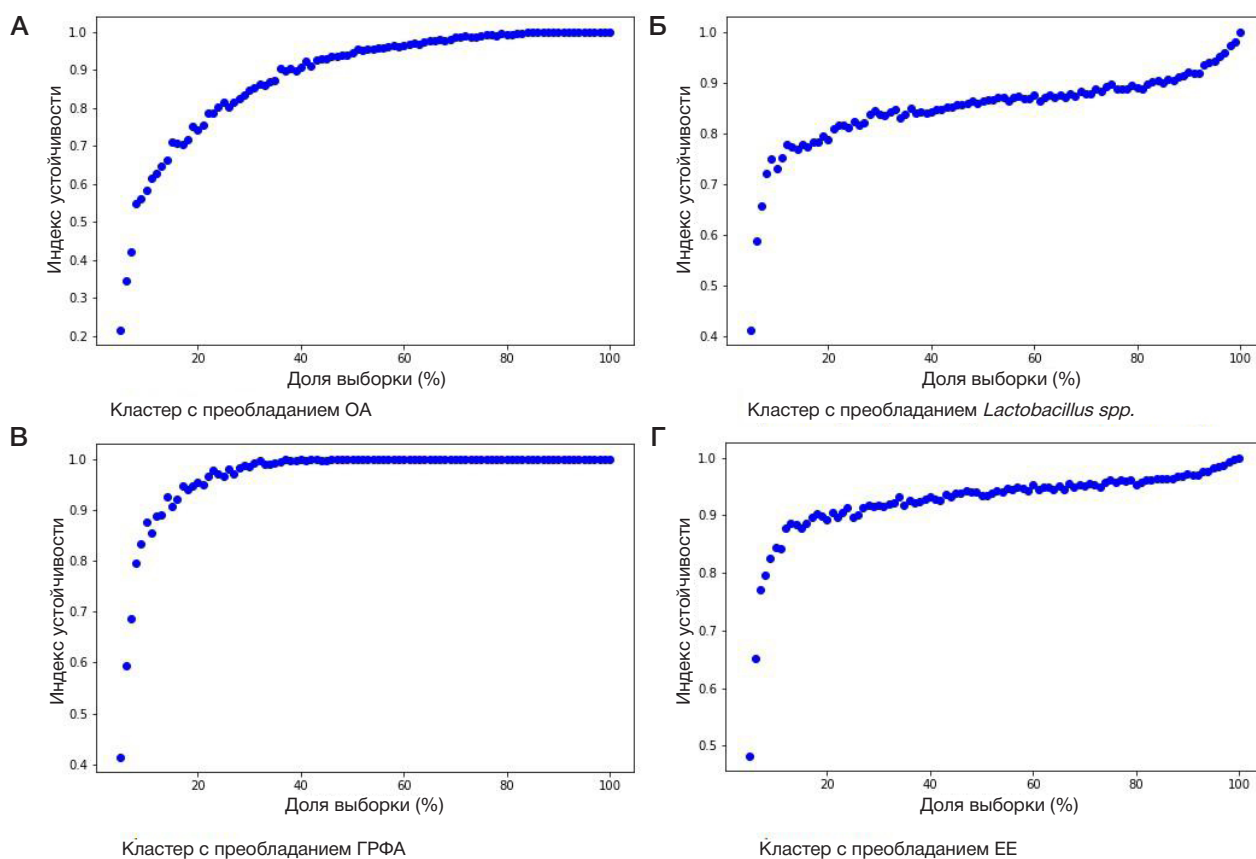


Рис. 2. Результаты исследования устойчивости кластера 1 (А), кластера 2 (Б), кластера 3 (В), кластера 4 (Г). Синим показан индекс устойчивости кластера на множестве объема f ; EE — *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.*, ГПФА — грамположительные факультативные анаэробы, ОА — облигатные анаэробы

Большинство положительных проб (40,2%) было отнесено к кластеру с преобладанием ОА; их доля в центроиде достигала 81,1% от всех выявляемых МО. Микробиота в этих образцах отличалась значительной гетерогенностью в пределах группы ОА без доминирования какого-либо вида. Подобный кластер, состоящий из облигатно анаэробных бактерий, был выделен в работе авторов, исследовавших микробиоту эякулята методом NGS-секвенирования [1]. Стоит отметить, что при использовании рутинного культурального исследования образцов эякулята с преобладанием ОА последние как преобладающая группа МО были идентифицированы только в 15% случаев [12].

Четверть образцов (25,2%) были отнесены к кластеру с преобладанием ГПФА. Именно этот вариант микробиоты ранее описывали как характерный для урогенитального тракта клинически здоровых мужчин [4]. В том числе в сперме мужчин без признаков инфекций, передающихся половым путем, культуральным методом обнаруживали бактерии родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Corynebacterium* (отнесенные к группе ГПФА) [22]. Однако факт выделения ГПФА из эякулята не всегда означает, что данная группа МО преобладает в данном биоматериале [12]. Применение современных молекулярно-генетических технологий позволяет также выявить трудно культивируемые и некультивируемые МО, что уточняет представление о вкладе данной группы МО в формирование микробиоты эякулята.

Несколько меньшее число проб эякулята (20,6%) было отнесено к кластеру с преобладанием *Lactobacillus spp.* Роль бактерий рода *Lactobacillus*, основных представителей нормальной микробиоты женского репродуктивного тракта, в составе микробиоты эякулята не настолько

очевидна. Одни авторы отмечают наличие лактобацилл в образцах эякулята при нормозооспермии и ассоциируют это с мужской фертильностью [8, 9]. Другие исследователи полагают, что повышенные количества *Lactobacillus spp.* в сперме являются маркером гормональных нарушений и основанием для дальнейшего расширенного обследования мужчины [23].

Кластер с преобладанием EE был самым малочисленным в исследованном нами пуле образцов; наличие данной микробиоты отметили только в 14,0% случаев. Представителей EE, в основном *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis*, принято считать частой причиной воспалительной патологии урогенитального тракта у мужчин [24]. Возможно, это обусловлено высокой частотой их выявления при культуральном исследовании. Например, при параллельном изучении образцов эякулята культуральным методом и методом ПЦР-РВ было показано, что почти в половине случаев, когда энтеробактерии и энтерококки культуральным методом определялись как преобладающие, с помощью ПЦР-РВ выявлялись другие преобладающие МО. Чаще всего это были ОА, что, по всей видимости, обусловлено сниженной способностью выделять анаэробов при культивировании *in vitro* [12]. Вклад *E. coli* и *E. faecalis*, как и других представителей группы EE, в нарушение фертильности и качества сперматозоидов окончательно не определен и требует дальнейшего изучения.

Настоящее исследование в очередной раз демонстрирует частое присутствие МО в образцах эякулята, отвечающих критериям нормозооспермии. Примечательно, что в большинстве исследованных проб микробиота была преимущественно представлена облигатно анаэробными бактериями, а не грамположительными факультативными

анаэробами, которые обнаруживали при культуральном исследовании [22].

ВЫВОДЫ

В половине случаев образцы эякулята, соответствующие критериям нормозооспермии, содержали микробиоту в надпороговых значениях. Выделенные микроорганизмы были сгруппированы с помощью кластерного анализа в четыре устойчивых типа по критерию преобладания определенной группы микроорганизмов: облигатных анаэробов, *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов, *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* Кластеры ранжированы по частоте встречаемости: вариант с преобладанием облигатных анаэробов, грамположительных факультативных

анаэробов, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* (определены в 40,2, 25,2, 20,6%, и 14,0% положительных образцов соответственно). По всей видимости, использование молекулярно-генетических методов приведет к переосмыслению представлений о составе микробиоты, определяемой в данном биоматериале при нормозооспермии. Вопрос ассоциации определенных вариантов микробиоты эякулята с воспалительной патологией репродуктивного тракта и нарушениями фертильности остается открытым. Не исключено, что существуют информативные микробиологические маркеры, ассоциированные с данными состояниями. Исследование микробного состава патологических образцов эякулята является следующим необходимым шагом для поиска таковых диагностических маркеров.

Литература

- Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019; 10: 234. Published 2019 Feb 12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan Italy 2021. Available from: <https://uroweb.org/guideline/urological-infections/>.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40 (2): 72–5. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2007.00825.x.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114 (19): 339–46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
- Baud D, Vulliamoz N, Ammerdorffer A, Gyger J, Greub G, Castella V, et al. Waddlia chondrophila, a Chlamydia-related bacterium, has a negative impact on human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2018; 33 (1): 3–10. DOI: 10.1093/humrep/dex342.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
- Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
- Mändar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–6. DOI: 10.1111/iju.13286.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
- Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
- Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril.* 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
- Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Паначева Е. А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2019; 1: 44–9. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.009.
- Почерников Д. Г., Витвицкая Ю. Г., Болдырева М. Н., Галкина И. С. Информативность биоматериала для исследования микробиоты урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-ПВ (пилотное исследование). *Экспериментальная и клиническая урология.* 2019; 2: 128–133. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132.
- WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
- Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR).* 1999; 31 (3): 264–323.
- Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007); p. 1027–35. DOI: 10.1145/1283383.1283494.
- Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987; 20: 53–65.
- Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.* PAMI-1. 1979; 2: 224–7.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (8): 851–3.
- Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 6876. DOI: 10.1038/s41598-020-63787-x.
- Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Иванов А. В., Почерников Д. Г., Паначева Е. А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-ПВ. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2020; 5: 66–73. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.064.
- Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl.* 2009; 32 (5): 462–7. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
- Почерников Д. Г., Постовойтенко Н. Т., Гетьман В. В., Галкина И. С. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus spp.* в эякуляте. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2020; 3: 42–48. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.039.
- Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50 (12): 1641–52. DOI: 10.1086/652861.

References

- Baud D, Pattaroni C, Vulliemmoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019;10:234. Published 2019 Feb 12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan Italy 2021. Available from: <https://uroweb.org/guideline/urological-infections/>.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40 (2): 72–5. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2007.00825.x.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114 (19): 339–46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
- Baud D, Vulliemmoz N, Ammerdorffer A, Gyger J, Greub G, Castella V, et al. Waddlia chondrophila, a Chlamydia-related bacterium, has a negative impact on human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2018; 33 (1): 3–10. DOI: 10.1093/humrep/dex342.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
- Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
- Māndar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–6. DOI: 10.1111/iju.13286.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
- Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
- Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril.* 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
- Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time PCR and culture-based technique. *Bulletin of RSMU.* 2019; 1: 41–6. DOI: 10.24075/brsmu.2019.009.
- Pochernikov DG, Vitvickaya YuG, Boldyreva MN, Galkina IS. Informativnost' biomateriala dlja issledovanija mikrobioty urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR-RV (pilotnoe issledovanie). *Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija.* 2019; 2: 128–133. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132. Russian.
- WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
- Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR).* 1999; 31 (3): 264–323.
- Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007); p. 1027–35. DOI: 10.1145/1283383.1283494.
- Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987; 20: 53–65.
- Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.* PAMI-1. 1979; 2: 224–7.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (8): 851–3.
- Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep.* 2020;10 (1): 6876. DOI: 10.1038/s41598-020-63787-x.
- Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernikov DG, Panacheva EA. Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data. *Bulletin of RSMU.* 2020; 5: 62–70. DOI: 10.24075/brsmu.2020.064.
- Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl.* 2009; 32 (5): 462–7. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
- Pochernikov DG, Postovoytenko NT, Getman VV, Galkina IS. Diagnostic significance of Lactobacillus spp. identification in ejaculate. *Bulletin of RSMU.* 2020; 3: 38–45. DOI: 10.24075/brsmu.2020.039.
- Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50 (12): 1641–52. DOI: 10.1086/652861.