

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации

На правах рукописи

Фаниев
Михаил Владимирович

**ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ МИКРОБИОМ КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА
МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ**

3.1.13. Урология и андрология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Кадыров Зиератшо Абдуллоевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ МИКРОБИОТЫ И ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНАХ МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ В ЭТИОЛОГИИ И ПАТОГЕНЕЗЕ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1 Нарушения репродуктивного здоровья мужчин: общие сведения, роль микробиоты и иммунологических нарушений.....	18
1.2 Иммунная система яичка	22
1.2.1 Функция гематотестикулярного барьера	23
1.2.2 Иммунные структуры яичка	24
1.3 Микробиом репродуктивной системы и влияние дисбиоза на репродуктивную функцию	29
1.3.1 Роль микробиома семенной жидкости в репродукции человека	32
1.3.2 Микробиом секрета предстательной железы.....	34
1.3.3 Состав микробиоты яичек и ее функции.....	37
1.4 Особенности мужского бесплодия, опосредованного изменениями состава микробиоты	42
1.5 Дисбиоз яичек и его взаимосвязь с мужским бесплодием.....	47
1.6 Состав микрофлоры семенной жидкости и снижение фертильности у мужчин ..	47
1.6.1 Методы оценки микробиома.....	47
1.6.2 Микрофлора семенной жидкости здоровых мужчин	50
1.6.3 Микрофлора семенной жидкости мужчин с измененным качеством эякулята.....	52
1.6.4 Изменения микрофлоры яичек и придатков яичек.....	57
1.7 Факторы, влияющие на микробиом яичек	59
1.7.1 Диета и микробиом кишечника	59
1.7.2 Сексуальные привычки	60
1.7.3 Инфекции, передающиеся половым путем	60
1.7.4 Влияние микробиома на результаты применения вспомогательных репродуктивных технологий	61
1.8 Методы коррекции дисбактериоза яичек.....	64
1.8.1 Хирургические методы коррекции варикоцеле в лечении бесплодия ...	64
1.8.2 Диета	68
1.8.3 Пробиотики и их влияние на мужскую репродуктивную функцию.....	69

1.8.4 Пробиотики, антиоксиданты и полифенолы	72
1.9 Перспективы дальнейших исследований микробиома мужской репродуктивной системы	73
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
2.1 Организация и дизайн исследования	79
2.2 Методы исследования	86
2.2.1 Клинические методы обследования пациентов	86
2.2.2 Лабораторные методы исследования	86
2.2.3 Инструментальные методы исследования	89
2.3 Статистическая обработка полученных данных	90
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ПРОГНОЗА НЕОБХОДИМОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ С ДОНАЦИЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ У МУЖЧИН НА ОСНОВАНИИ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТКАНИ ЯИЧКА ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА...	92
3.1 Изучение патогенетической роли СРАЗ-позитивных тучных клеток яичка в нарушениях сперматогенеза	92
3.2 Критерии и методы оценки нарушений сперматогенеза	93
3.3 Характеристика нарушений сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии.....	94
3.4 Сравнительная оценка распределения тучных клеток в семенных канальцах при необструктивной и обструктивной азооспермии	96
3.5 Цитоморфологическая характеристика СРАЗ-позитивных тучных клеток у пациентов с различными формами азооспермии	99
3.6 Разработка метода прогнозирования применения вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин с необструктивной азооспермией	106
3.6.1 Современные подходы к оценке нарушений сперматогенеза при мужском бесплодии	106
3.6.2 Количественная оценка тучных клеток в интерстиции яичка	108
3.6.3 Алгоритм клинического применения метода	109
3.6.4 Клинические примеры применения метода	110
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТИКУЛЯРНОЙ И УРЕТРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ АЗООСПЕРМИИ И СОПУТСТВУЮЩИМ ВАРИКОЦЕЛЕ	113
4.1 Разработка метода малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин	113
4.2 Таксономический состав микробиоты уретры	118

4.3 Частота встречаемости различных представителей микробиоты уретры.....	121
4.4 Таксономический состав микробиоты ткани яичка	124
4.5 Частота встречаемости различных представителей микробиоты яичка	128
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОИСКА ВЗАИМОСВЯЗЕЙ УРОВНЕЙ ГОРМОНОВ, ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБИОТЫ УРЕТРЫ И ТКАНИ ЯИЧКА У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ АЗООСПЕРМИИ И СОПУТСТВУЮЩИМ ВАРИКОЦЕЛЕ.....	131
5.1 Показатели гормонального статуса и шкалы нарушений сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле ...	131
5.2 Взаимосвязь состава микробиоты уретры с клинико-лабораторными показателями пациентов с необструктивной азооспермией.....	132
5.3 Результаты поиска взаимосвязей состава микробиоты уретры с клинико-лабораторными показателями пациентов с обструктивной азооспермией.....	138
5.4 Результаты поиска взаимосвязей характеристик микробиоты ткани яичка с клинико-лабораторными показателями пациентов с необструктивной азооспермией	142
5.5 Взаимосвязь состава микробиоты ткани яичка с клинико-лабораторными показателями пациентов с обструктивной азооспермией.....	147
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВАНИИ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБИОТЫ ЯИЧКА И УРЕТРЫ ПАЦИЕНТОВ С АЗООСПЕРМИЕЙ	154
6.1 Уровни гормонов и показателей шкалы нарушений сперматогенеза у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ	154
6.2 Таксономический состав микробиоты ткани яичка у пациентов с различными формами азооспермии.....	157
6.3 Таксономический состав микробиоты уретры на уровне фил у пациентов с азооспермией.....	160
6.4 Сравнительный анализ индексов альфа-разнообразия микробиоты уретры и ткани яичка	163
6.5 Сравнение таксономического состава микробиоты ткани яичка и уретры на уровне семейств у пациентов с НОА в зависимости от результатов применения ВРТ	165
6.6 Сравнение таксономического состава микробиоты ткани яичка и уретры на уровне семейств у пациентов с ОА в зависимости от результатов применения ВРТ	169
6.7 Разработка классификационной модели прогноза эффективности программ ВРТ на основе характеристик микробиоты яичка и уретры у пациентов с необструктивной азооспермией	173

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	176
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	192
ВЫВОДЫ	196
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	201
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	202
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	204

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Коррекция нарушений мужского репродуктивного здоровья является важнейшей, нерешенной до настоящего времени проблемой здравоохранения. Тщательная оценка его различных аспектов должна предусматривать изучение клинических андрологических и сексологических компонентов [21, 25, 182, 254].

Бесплодие определяется как неспособность пары в детородном возрасте зачать ребенка после одного года регулярной половой жизни без применения контрацепции. Эта проблема затрагивает около 10–20% пар в экономически развитых странах, при этом более чем в трети случаев точную причину бесплодия установить не удаётся. Реальная диагностика мужского бесплодия достаточно сложна, неточность оценок при этом обусловлена неоднородностью используемых клинических подходов [4, 31, 236]. Так, в большинстве случаев диагностика ограничивается анализом спермы, а лечение заключается в использовании вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [59, 189]. В связи с этим ряд авторов в настоящее время приходят к выводу, что определение «идиопатического» или «необъяснимого» бесплодия следует ограничивать и использовать только в случаях, когда проведена тщательная диагностика [38, 293].

Помимо таких заболеваний, как варикоцеле и других четко охарактеризованных врожденных или приобретенных причин бесплодия, на мужскую фертильность могут существенно влиять факторы образа жизни, включая пищевые привычки, курение и употребление алкоголя [15, 48, 226], воздействие экологических факторов, в частности, эндокринных дизрапторов, связанное с производственной деятельностью человека [36, 40, 254], а также метаболические нарушения [186].

Актуальным направлением представляется повышение эффективности скрининга мужской инфертильности, в том числе с использованием современных лабораторных методов на основе определения различных биохимических,

иммунологических и молекулярных маркеров [49, 208, 256]. На сегодняшний день в урологической практике практически отсутствуют надежные методы точной диагностики мужского бесплодия, основанные на использовании последних достижений иммунологии, молекулярной биологии и генетики. В частности, внимание специалистов в этом вопросе привлекают характеристики микробиологического пейзажа эякулята.

Степень разработанности темы исследования. Репродукция – сложный процесс, в основе которого лежит взаимодействие эндокринной, иммунной систем организма человека и микробиоты [274, 309]. Тестикулярный иммунитет характеризуется так называемой иммунной привилегией, которая обеспечивает отсутствие аутоиммунных атак против белков, экспрессируемых сперматозоидами [147, 212, 297, 301]. Результаты ряда исследований продемонстрировали жизненно важную роль микробиома человека не только в отношении развития, но и в предотвращении возникновения широкого спектра заболеваний - от ожирения и метаболического синдрома до энтероколита, болезни Паркинсона и даже таких состояний, как депрессия [25, 162, 167, 207].

В настоящее время в наиболее изученной в организме человека представляется микробиота кишечника. Именно ей отводится важнейшая роль в патогенезе ряда заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом и реакциями иммунной системы [124, 125]. Доказано, что симбиотические отношения между кишечной микробиотой и другими бактериями могут влиять на выраженность и направленность иммунного ответа, обуславливая в некоторых случаях развитие аутоиммунных процессов. В то же время роль микроорганизмов мочевыводящих путей изучена недостаточно, состав и свойства микробиоты урогенитального тракта остаются предметом дискуссий, активно проводятся исследования по изучению ее многогранной роли [17, 195, 335]. К настоящему времени показано, что ряд микроорганизмов обладают защитными свойствами в отношении уропатогенов, что обеспечивается, например, продукцией антимикробных пептидов или других противомикробных соединений, которые обладают бактериостатическими или бактерицидными свойствами [10, 310].

Общепризнанно, что микроорганизмы, присутствующие в мочевыводящих путях, как и в других областях организма, влияют на анатомические и физиологические характеристики тканей, которые они колонизируют, участвуют в регуляции ряда функций, в том числе репродуктивной [133, 134, 136, 312]. Это, в свою очередь, свидетельствует о важнейшей роли микробиоты мочевыводящих путей и репродуктивных органов как в патогенезе нарушений фертильности, так и в механизмах ее сохранения и восстановления.

Следует отметить, что микробный дисбаланс, выявляемый при широком спектре заболеваний урологического тракта, нередко является ключевым этиологическим фактором их развития [69, 131, 329]. Выявление подобных факторов и разработку подходов к воздействию на них следует рассматривать в качестве перспективных направлений исследований, которые, возможно, будут способствовать разработке новых методов профилактики и лечения заболеваний репродуктивной системы и мочевыводящих путей и в результате - коррекции нарушений фертильности.

Ситуация осложняется тем, что в настоящее время стандартные методы исследования позволяют выявлять не более 2% известных штаммов бактерий [39, 142]. Даже при наличии возможностей точной качественной и количественной оценки биоразнообразия, характеризующего микроорганизмы, присутствующие в репродуктивной системе, до настоящего времени не выработаны четкие представления о прикладной значимости большей части такого рода информации, в первую очередь отсутствуют критерии определения нормы и патологических изменений при анализе результатов изучения микробиоты мужской репродуктивной системы [303, 351]. До настоящего времени не получено подтверждений о наличии количественно охарактеризованных ассоциаций характеристик микробиоты с показателями мужского репродуктивного здоровья

Все это подтверждает актуальность исследований вышеуказанных аспектов, в том числе с применением технологий нового поколения, таких как секвенирование нового поколения (NGS). Появление технологии массового параллельного секвенирования позволило к настоящему времени описать

значительную часть человеческого микробиома – дыхательных путей, кожи, ротовой полости, кишечника и влагалища. Результаты исследований последних лет позволили выдвинуть гипотезу о том, что ткань яичка не является микробиологически стерильной, при этом нарушения фертильности могут быть ассоциированы с характеристиками дисбиоза с преобладанием определенного микробиома.

Цель исследования: улучшение результатов диагностики и лечения пациентов с мужским фактором бесплодия на основании углубленной оценки патогенного тестикулярного микробиома.

Для выполнения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить иммуноморфологические характеристики ткани яичка у инфертильных мужчин с обструктивной и необструктивной азооспермией.
2. Разработать метод выделения бактериальной ДНК из биоптата яичка с целью определения тестикулярного микробиома у инфертильных мужчин.
3. Оценить нарушения микробиома в тестикулярной ткани у пациентов с нарушениями сперматогенеза на основе исследования бактериальной ДНК методом высокопроизводительного секвенирования NGS для определения таксономического состава на основе семейств и видов микроорганизмов и идентифицировать наличие таксономического разнообразия тестикулярного микробиома у пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией.
4. Провести корреляционный анализ ассоциаций значимых характеристик микробиоты уретры и тестикул с показателями гормонального статуса и нарушениями сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле.
5. Выявить взаимосвязи значимых характеристик микробиоты уретры и тестикул с показателями нарушений сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле.
6. Изучить взаимосвязи характеристик таксономической структуры тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии с результатами применения программ вспомогательных

репродуктивных технологий.

7. Разработать и использовать модель прогноза эффективности программ ВРТ на основе характеристик микробиоты яичка и уретры у инфертильных пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией.

8. Предложить патогенетически обоснованную концепцию ведения пациентов с мужским фактором бесплодия с использованием методов оценки тестикулярного микробиома и прогноза результатов применения вспомогательных репродуктивных технологий при нарушениях сперматогенеза различной этиологии.

Научная новизна исследования

1. Впервые в России установлена ключевая роль тучных клеток с активной триптазой (СРА3+) в патогенезе азооспермии. Выявлена положительная корреляция между их количеством в интерстиции яичка и тяжестью нарушений сперматогенеза, что определяет новые мишени для терапевтического воздействия (патент РФ №2814377 от 28.02.2024 «Способ определения необходимости выполнения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов при идиопатическом мужском бесплодии с необструктивной азооспермией»; патент РФ №2830702 от 26.11.2024 «Способ определения необходимости выполнения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов при обструктивном мужском бесплодии»).

2. Разработан новый диагностический инструмент – метод малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата ткани предстательной железы и тестикул (патент РФ №2810467 от 28.10.2023 «Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин»; патент РФ №2830876 от 26.11.2024 «Способ малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата ткани предстательной железы»). Внедрение этого метода в практику впервые позволило проводить прямое исследование тестикулярного микробиома.

3. Получены новые данные, свидетельствующие о нестерильности

тестикулярного микробиома и статистически значимых различиях его состава при разных формах азооспермии (НОА и ОА). Эти данные показывают важную роль микробиоты и воспалительного процесса в развитии бесплодия. Это открывает новую страницу в понимании еще одного механизма развития мужского бесплодия и позволяет внедрить в клиническую практику исследование микробиома как новой диагностической опции.

4. Впервые выявлен комплекс значимых связей между гормональным фоном мужчины и составом тестикулярной микробиоты. Обнаружены специфические бактериальные таксоны, ассоциированные с маркерами функции яичек (ФСГ, ЛГ, ингибин В, тестостерон), что указывает на потенциальное влияние микробиома на эндокринную регуляцию сперматогенеза.

5. Установлены конкретные бактериальные сообщества, ассоциированные с тяжестью нарушения сперматогенеза. Это позволяет рассматривать определенные таксоны уретрального и тестикулярного микробиома в качестве новых биомаркеров для диагностики.

6. Обнаружены специфические особенности тестикулярного микробиома, которые являются статистически значимыми предикторами успеха программ ВРТ. Это дает принципиально новую информацию для прогнозирования шансов наступления беременности в программах ВРТ.

7. Впервые в России разработаны и валидированы высокоточные диагностические модели на основе анализа микробиома для прогноза исхода ВРТ. Модели имеют высокий потенциал для внедрения в клиническую практику для персонализированного прогнозирования.

8. Предложена инновационная комплексная патогенетическая концепция диагностики мужского бесплодия, интегрирующая данные о тестикулярном микробиоме, иммуноморфологии и современных методах молекулярной генетики. Данная концепция базируется на установлении факта взаимосвязи микробиоты и бесплодия и направлена на переход к персонализированной медицине в репродуктологии.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы позволяют расширить представления о роли иммунологических показателей (содержания СРАЗ-позитивных тучных клеток яичка) и характеристик микробиоты в нарушениях сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии.

Разработанный и апробированный в работе метод малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата ткани яичка позволяет усовершенствовать подходы к характеристике микробиоты тестикулярной ткани и тем самым усовершенствовать подходы к оценке мужского репродуктивного потенциала. Предложенный комплекс мероприятий позволил обосновать алгоритм выбора тактики преодоления мужской инфертильности, в том числе путем эффективного применения ВРТ.

Установленные различия спектра микробиоты тестикулярной ткани пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией представляют собой потенциал для разработки микробиологических биомаркеров и персонализированных терапевтических подходов.

Результаты исследования подчеркивают перспективность дальнейшего изучения микробиоты как фактора, влияющего на эффективность ВРТ, и могут служить основой для разработки микробиомно-ориентированных терапевтических стратегий.

Продемонстрировано, что применение разработанных прогностических моделей позволяет повысить эффективность программ ВРТ, тем самым принять своевременные меры к реализации повторного протокола ВРТ с использованием аутоспермиев или донацией половых клеток, что в свою очередь способствует уменьшению длительности программы и снижению субъективности морфологической оценки сперматогенеза.

По результатам разработан набор праймеров для полимеразной цепной реакции при оценке микробиома уретры и ткани яичка, применение которого позволит существенно повысить точность диагностики нарушений сперматогенеза и персонализации ведения мужчин с различными видами

азооспермии.

Выявленные нарушения относительной представленности отдельных семейств микробиоты уретры и яичек у пациентов с обструктивной азооспермией позволяют выдвинуть гипотезу о «микробиоте фертильности тестикул», учет которой может быть использован при прегравидарной криоконсервации в программах ВРТ и разработке диагностических тестов для отбора сперматозоидов в программах искусственного оплодотворения.

Методология и методы исследования. В работе проведен ретроспективный и проспективный анализ данных 108 пациентов с мужским бесплодием, обследованных в 2018–2024 гг. на базе отделения ВРТ Центра репродуктивной и клеточной медицины ГБУЗ ДГКБ г. Краснодар. Материалом исследования послужили результаты обследования, включая образцы тестикулярной ткани пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле. Критериями включения являлись: возраст ≥ 18 лет, бесплодие в браке > 1 года, подтвержденная обструктивная или необструктивная азооспермия, отсутствие двусторонних поражений яичек, ИППП, антибактериальной терапии за 3 месяца до исследования, а также подписанное информированное согласие. Всем пациентам выполнена microTESE в рамках протокола ВРТ с последующим патогистологическим исследованием, оценкой сперматогенеза по шкале De Kretser и Holstein, иммуногистохимическим окрашиванием с анти-МСТ, а также анализом микробиоты тестикулярной ткани и уретры методом NGS (секвенирование гена 16S рРНК). Исследование проведено в четыре этапа: 1) обоснование прогноза применения ВРТ с донацией сперматозоидов на основе иммуноморфологических характеристик ($n=34$); 2) разработка метода выделения бактериальной ДНК из биоптата яичка ($n=76$); 3) поиск взаимосвязей гормонального статуса и микробиоты; 4) сравнительный анализ таксономической структуры микробиоты у пациентов с разными исходами ВРТ с применением машинного обучения (метод «дерево решений»).

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммунологический фактор играет ключевую роль в патогенезе

нарушений сперматогенеза при азооспермии (повышение содержания тучных клеток СРАЗ+ в тестикулярной ткани). Обнаружена значимая положительная корреляция между их количеством в ткани яичка и выраженностью нарушений сперматогенеза, что открывает новые направления для терапии.

2. Разработанный в клинической практике новый диагностический инструмент – метод малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из тестикулярной ткани - позволяет проводить прямое исследование тестикулярного микробиома. С помощью данной методики доказано, что тестикулярный микробиом не стерилен, его спектр статистически значимо различается при разных формах азооспермии (необструктивной и обструктивной).

3. Статистически значимые корреляционные связи между уровнем гормонов яичек (ФСГ, ЛГ, ингибин В, тестостерон) и специфическими таксонами тестикулярной микробиоты, выявляемые у инфертильных пациентов, свидетельствуют о потенциальном модулирующем влиянии микробиома яичка на эндокринную регуляцию сперматогенеза.

4. Ассоциированность идентифицированных бактериальных сообществ с тяжестью нарушения сперматогенеза позволяет рассматривать определенные таксоны уретрального и тестикулярного микробиома в качестве новых диагностических биомаркеров у инфертильных пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией.

5. Специфические особенности тестикулярного микробиома являются статистически значимыми предикторами положительного исхода программ ВРТ. Разработанные и валидированные высокоточные диагностические модели позволяют прогнозировать эффективность программ ВРТ на основе анализа микробиома с точностью >91%.

6. Предложенная комплексная патогенетическая концепция диагностики мужского бесплодия интегрирует полученные данные о тестикулярном микробиоме, иммуноморфологических изменениях в тестикулярной ткани и возможностях применения молекулярно-генетических методов. Внедрение этой концепции в клиническую практику подчеркивает важную роль микробиоты и

воспалительного процесса в развитии бесплодия и дает возможность расширить применение принципов персонализированной медицины в репродуктологии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования обеспечивается адекватным объемом клинического материала, репрезентативностью комплексного, многоуровневого обследования пациентов, адекватностью полученных результатов поставленной цели и задачам исследования, использованием современных методов статистической обработки полученных данных.

Основные результаты исследования представлены в виде докладов на: II Всероссийской научно-практической конференции (Краснодар, 2021); 7-ой междисциплинарной конференции специалистов Юга «Инновационные технологии охраны репродуктивного здоровья» (Сочи, 2023); Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы мужского здоровья», посвященная 90-летию со дня рождения д.м.н., профессора, член-корреспондента РАМН, В.Н. Степанова (Москва, 2023); V Всероссийской научно-практической конференции (Краснодар, 2024); 8-ой междисциплинарной конференции специалистов Юга «Инновационные технологии охраны репродуктивного здоровья» (Сочи, 2024); XX Конгрессе «Мужское здоровье» (Сочи, 2024); VI Невском Урологический Форуме (Санкт-Петербург, 2024); XXIV Конгрессе Российского общества урологов (Екатеринбург, 2024); 9-ой междисциплинарной конференции специалистов Юга «Инновационные технологии охраны репродуктивного здоровья» (Сочи, 2024); XXI Конгрессе «Мужское здоровье» (Сочи, 2025); XXV Конгрессе Российского общества урологов (Казань, 2025); V Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы уроандрологии и репродуктивного здоровья у мужчин» в рамках «Медицинской образовательной недели РУДН» (Москва, 2025).

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: 3.1.13 – Урология и андрология, по тематике, методам исследования и научным положениям соответствует п.2 «Разработка и усовершенствование методов

диагностики и профилактики урологических и андрологических заболеваний», п.3 «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения урологических и андрологических заболеваний и внедрение их в клиническую практику».

Результаты работы и предложенный протокол ведения инфертильных больных с различными видами азооспермии внедрены в работу Центра репродуктивной и клеточной медицины, отделения вспомогательных репродуктивных технологий г. Краснодара.

Материалы работы включены в лекционные курсы для курсантов, ординаторов и аспирантов кафедры эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики факультета непрерывного медицинского образования Российского Университета Дружбы народов им. Патриса Лумумбы.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах подготовки диссертационной работы. Автором были сформулированы цель и задачи, исходя из них составлен дизайн исследования. Разработаны технические приемы, используемые в процессе изучения микробиоты мочевыводящих путей и репродуктивной системы у мужчин.

Проведен поиск и анализ научной литературы по изучаемой проблеме. В ходе реализации исследования диссертант лично проводил набор, скрининг, обследование, хирургическое лечение и последующее наблюдение пациентов, включенных в исследование.

Автором выполнен статистический анализ полученных данных, их описание и анализ, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации.

По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, в том числе 26 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 1 учебно-методическое пособие, 2 монографии, получено 5 патентов на изобретения.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 6 глав с изложением результатов

собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов, практических рекомендаций и списка литературы.

Общий объем диссертации изложен на 243 страницах, работа иллюстрирована 46 рисунками и 34 таблицами. Список литературы включает 357 источников, в том числе 40 отечественных и 317 зарубежных публикаций.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ МИКРОБИОТЫ И ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНАХ МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ В ЭТИОЛОГИИ И ПАТОГЕНЕЗЕ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Нарушения репродуктивного здоровья мужчин: общие сведения, роль микробиоты и иммунологических нарушений

Бесплодие, определяемое в настоящее время как неспособность зачать ребенка после одного года половой жизни без контрацепции, диагностируется в последние годы у 10–15 % пар, доля варьирует в зависимости от страны и географического региона, причем с начала 1960-х гг. частота бесплодия в мире выросла с 7–8% до 10-15% [8, 19, 21]. Мужской и женский факторы значимы в отношении в равной степени в отношении инфертильности, однако нередко отмечается влияние более одного этиологического фактора этой патологии [179, 316, 338].

В последние несколько десятилетий специалисты отмечают значительное ухудшение репродуктивного здоровья мужчин, что связывают преимущественно с результатом попадания синтетических загрязняющих веществ в окружающую среду в значительных количествах [99, 188, 253]. Одной из ключевых публикаций, отражающих серьёзность проблемы ухудшения репродуктивного здоровья мужчин, явилась работа Carlsen E. et al. (1992), в которой автором было показано снижение среднего количества сперматозоидов у мужчин во всем мире в период с 1940 по 1990 гг. в 2 раза [109]. Полученные данные заставили специалистов, в частности, Swan S. et al. (1997) провести повторную ретроспективную оценку изменений качества спермы в различных регионах мира, в результате чего значительное снижение концентрации сперматозоидов у мужчин в западных странах было подтверждено [292].

Параллельно специалисты ряда стран сообщили о росте заболеваемости злокачественными опухолями и пороками развития яичка (в том числе,

крипторхизма и гипоспадии). Увеличение распространённости мужского бесплодия лишь отчасти можно объяснить хроническими заболеваниями, а также наследственными и прочими нарушениями состояния здоровья [12, 88, 184]. Наблюдаемые негативные тенденции явились стимулом для проведения исследований по оценке роли внешних факторов в снижении репродуктивного здоровья мужчин. Была выдвинута гипотеза, согласно которой растущая частота аномалий мужской репродуктивной системы может быть вызвана воздействием химических веществ, обладающих эстрогенными свойствами [45, 116, 276]. Было показано, что как состояние окружающей среды, так и условия профессиональной деятельности могут способствовать воздействию на организм сложных смесей веществ – эндокринных дизрапторов (ЭД), которые играют важную роль в развитии нарушений фертильности. Повсеместное присутствие загрязняющих веществ в окружающей среде и их способность влиять на развитие и функцию мужской репродуктивной системы были многократно подтверждены [183].

Диагноз мужского бесплодия устанавливается на основании оценки спермограммы и уровня половых гормонов. При анализе спермы оцениваются количество, подвижность и морфология сперматозоидов. Хотя анализ спермы проводится в повседневной практике в клинических и исследовательских лабораториях по всему миру, причина мужского бесплодия в значительной степени остаётся не до конца изученной: это состояние не может быть объяснено ни гормональными нарушениями, ни нарушениями функции яичек, ни генетическими факторами, такими как синдром Клайнфельтера (XXY), перестройки в гене AZF и мутации других генов, связанных с бесплодием – таких, как AR, CFTR, NR5A1 и SRY [44, 217, 218].

Установлена однозначная отрицательная корреляция между нарушениями сперматогенеза и факторами образа жизни, такими как употребление алкоголя, курение, употребление наркотиков и ожирение, вызванное высококалорийной диетой [73, 111]. Периодическое воздействие избыточного тепла, шума, вибраций и электромагнитных полей может вызвать накопление повреждений ДНК сперматозоидов и снижать фертильность мужчин [187, 224, 316].

Всё это показывает, что сперматогенез и мужская фертильность могут зависеть от множества обстоятельств, сформированных многолетним воздействием различных загрязнителей, содержащихся в окружающей среде, в сочетании с генетическими факторами.

Общепризнанно, что реализация мужской репродуктивной функции обеспечивается сложным механизмом взаимодействия эндокринной и иммунной систем. Яичко является органом, в котором происходит непрерывное образование половых клеток, процесс, представляющий собой первый этап мужского репродуктивного процесса [316]. Собственно, сперматогенез регулируется гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системой, обеспечивающей выработку половых стероидных гормонов [153, 322].

С другой стороны, в яичке функционирует специализированная иммунная система, которая характеризуется толерантностью к антигенным белкам, экспрессируемым сперматозоидами [205, 206]. Указанное свойство получило название «иммунной привилегии», которое означает защиту сперматозоидов от аутоиммунных реакций с участием иммунных клеток половых желез [225, 324].

Кроме того, важной структурой яичка является так называемый гематотестикулярный барьер (ГТБ), который обеспечивает изоляцию половых клеток от воздействия на них эффекторов иммунной системы [91, 288]. Известно, что изменения состава микробиоты органов мужской репродуктивной системы и иммунологические сдвиги в организме в результате нарушений обмена веществ, воспалительных процессов и инфекционных заболеваний, а также травмы – все эти факторы могут привести к развитию аутоиммунных заболеваний и бесплодию [81, 179].

Микробиота представляет собой совокупность комменсальных микроорганизмов, локализованных в разных органах и тканях, которые отражают состояние здоровья хозяина [241, 250]. Термином «микробиом» обозначают разнообразие микроорганизмов, населяющих определённые органы, системы или биологические среды [132, 260]. В частности, кишечный микробиом является наиболее многочисленным в организме (около 80%), он препятствует

колонизации пищеварительного тракта патогенными микроорганизмами, участвует в процессах всасывания и метаболизма питательных веществ, а также в развитии иммунной системы [75, 341]. Следует отметить, что только 9% микробиоты человека сосредоточено в мочеполовом тракте; полагают, что основное влияние на процессы полового созревания у мужчин и женщин оказывает кишечная микробиота [135]. Метаболиты микроорганизмов кишечника, такие как вторичные желчные кислоты, а также индол и продукты расщепления соевых бобов фактически осуществляют регуляцию работы мужских и женских половых органов [56, 158].

Кишечная микробиота состоит из четырех основных типов микроорганизмов, а именно: бактероидов (Bacteroidota), бацилл (Bacillota), актиномицетов (Actinomycetota) и псевдомонад (Pseudomonadota), причём к первым двум типам можно отнести 90% всех кишечных бактерий. Нарушение состава кишечной микрофлоры, в том числе в связи с питанием с высоким содержанием жиров и калорий, может привести к развитию дисбиоза – состоянию, которое со временем способствует возникновению различных заболеваний [181, 223].

По мнению Lundy S.D. et al. (2021), *Lactobacillus*, *Pseudomonas* и *Prevotella* представляют собой основные бактерии, содержащиеся в семенной жидкости, и их замещение другими патогенными бактериями также может вызывать дисбиоз, который, в свою очередь, способствует возникновению бесплодия [178].

Ряд культурально-зависимых и независимых исследований показали, что количество и значимость видов бактерий в сперме, возможно, были недооценены. Так, Chen H. et al. (2018) проводили изучение семенного микробиома у пациентов с обструктивной или необструктивной азооспермией. Для секвенирования геномной ДНК, выделенной из спермы здоровых людей (группа С), пациентов с обструктивной азооспермией (группа ОА) и пациентов с необструктивной азооспермией (группа НОА), был использован метод высокопроизводительного секвенирования. Было превалирование в этой биологической среде видов Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes и Actinobacteria, в группах С (98,14%), ОА

(98,26%) и NOA (90,96%). У пациентов групп ОА и НОА были выявлены максимальные количества Bacteroidetes и Firmicutes, тогда как количество протеобактерий и актинобактерий у этих пациентов было снижено по сравнению с группой С. Всего было обнаружено 398 общих операционных таксономических единиц, из них 27 относились к роду Lactobacillus [271].

Также показано, что наличие патогенных микроорганизмов и снижение биоразнообразия в сперме при азооспермии могут являться своеобразным маркером и фактором риска метаболических и иммунологических нарушений [89, 197]. Этими авторами был изучен семенной микробиом пациентов с обструктивной или необструктивной азооспермией и предложено использование ее характеристик для разработки новых лечебно-диагностических подходов при азооспермии.

Таким образом, при анализе причин мужской инфертильности необходимым представляется анализ особенностей микробиоты организма и иммунного статуса, в частности функционирование иммунной системы яичек и состояния ГТБ. С учётом этих представлений необходимо изучение влияния микробиоты кишечника и микрофлоры мужских половых органов на иммунную систему яичек для выявления дисбиотических состояний, потенциально влияющих на функцию половых желез и фертильность.

1.2 Иммунная система яичка

Иммунная привилегия распространяется лишь на несколько органов человеческого организма, в число которых входят яички. Установлено, что белки, экспрессируемые на поверхности клеточной мембраны сперматозоидов, способны запускать мощную иммунную реакцию, которая может вызывать разрушение сперматозоидов, что в итоге приводит к бесплодию. Развитие иммунной привилегии опирается на два основных механизма:

- физическое препятствие в виде ГТБ, состоящего в основном из клеток Сертоли (КС);

- иммунологическая толерантность, обеспечиваемая иммунными структурами яичек.

Эпителий извитых семенных канальцев содержит КС, которые обеспечивают половые клетки питательными веществами и факторами роста [324]. Между канальцами расположены клетки Лейдига, выделяющие тестостерон, необходимый для сперматогенеза [148, 332]. В интерстициальном пространстве яичка находятся лимфатические сосуды, которые обеспечивают сообщение с регионарными лимфатическими узлами [160]. Перитубулярные лимфатические синусоидные капилляры окружают семенные канальцы и располагаются под белочной оболочкой [327]. В интерстиции содержатся макрофаги, дендритные клетки (ДК), тучные клетки (ТК) и Т-клетки [79, 96, 271, 315].

1.2.1 Функция гематотестикулярного барьера

ГТБ состоит из плотных контактов, щелевых контактов, десмосомоподобных контактов и КС. Структура ГТБ поддерживается за счёт соединений N-кадгерина и бета-катенина в области щелевых контактов, а также окклюдина и белка ZO-1 плотных контактов, каждый из которых закрепляется путем связывания с пучками F-актина [299]. Перечисленные контакты препятствуют попаданию гаплоидных половых клеток в кровь [209]. КС обеспечивают поддержку половых клеток, поставляя им глюкозу, жирные кислоты и факторы роста, а также способствуют поддержанию необходимого ионного и метаболического состава ткани яичек [163]. Кроме того, КС секретируют факторы, которые содействуют функционированию защитных иммунных структур яичек, таких как трансформирующий фактор роста (ТФР) бета-1, предотвращающих разрушение сперматозоидов в результате аутоиммунных реакций.

В качестве дополнительного защитного механизма КС также обладают способностью фагоцитировать половые клетки, находящиеся в состоянии

апоптоза, и образующиеся в ходе этого процесса остаточные тельца. Собственная фагоцитарная активность КС реализуется с помощью рецепторов этих клеток с тирозинкиназной активностью Axl, tyro3 и Mer, а также белка 6, специфичного к задержке роста (GAS6) [97, 278].

В свою очередь фагоцитоз, опосредованный КС, способствует поддержанию сперматогенеза за счёт различных механизмов:

- обеспечение дифференцировки половых клеток;
- устранение вредных веществ, выделяемых из некротизированных половых клеток;
- элиминация аутоантигенов, которые могут вызывать развитие аутоиммунных реакций;
- обеспечение других КС источниками энергии за счёт переработки апоптотических телец половых клеток [190, 229].

1.2.2 Иммунные структуры яичка

ГТБ, состоящий из КС, представляет собой физическое препятствие, предназначенное для защиты половых клеток от разрушительных последствий иммунных реакций. В дополнение к указанному механизму, иммунные клетки яичек либо участвуют в поддержании толерогенной среды, либо защищают структуры, участвующие в сперматогенезе, от проникновения патогенов; таким образом, эти клетки контролируют воспалительные процессы, которые часто являются причиной мужского бесплодия [63, 193, 346].

Получены доказательства того, что инфекции или воспалительные состояния могут ингибировать стероидогенез, способствуют усилению апоптоза половых клеток и деструкции эпителиальных клеток яичек, тем самым провоцируя развитие бесплодия [139, 190].

Известно, что иммунный ответ включает два основных звена – систему врожденного иммунитета и адаптивную иммунную систему [126]. Фагоциты (гранулоциты и макрофаги), естественные клетки-киллеры и дендритные клетки

(ДК) [основные антигенпрезентирующие клетки (АПК)] участвуют в реакциях врождённого иммунитета. С другой стороны, Т- и В-лимфоциты распознают специфичные для каждой из клеток антигены и отвечают за формирование иммунологической памяти. Т-клетки подразделяются на различные подтипы, такие как Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты и Т-регуляторные (Treg) клетки [294].

Макрофаги яичек происходят из трёх различных источников:

- макрофаги, формирующиеся на ранних стадиях в желточном мешке;
- моноциты печени плода;
- моноциты костномозгового происхождения [339]. Экспериментальные исследования показали, что макрофаги яичек способны поддерживать существование локальной иммунной привилегии, что было показано в экспериментах на крысах. В яичках этих животных указанные активированные фагоциты продуцируют противовоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ)-10, а также способствуют увеличению количества Treg клеток [71, 161, 196].

Воспаление ткани яичек вызывается либо бактериями, такими как *Escherichia (E.) coli* и *Klebsiella spp.*, либо вирусами (ВИЧ-1, вирус Zika, орторубулавирус эпидемического паротита) [85, 318]. В экспериментах была продемонстрирована роль процесса инфильтрации яичек макрофагами, происходящими из моноцитов, которые запускают местные воспалительные реакции, хотя факт дифференцировки периферических моноцитов в макрофаги яичек нуждается в дополнительном подтверждении [357]. Более того, было показано, что инфицированные макрофаги яичек изменяют свойства плотных контактов между КС и могут вызывать нарушение целостности ГТБ [55].

Тестикулярные макрофаги разделяют на три группы:

- ED-1-распознающие макрофаги – класс провоспалительных клеток, которые продуцируют фактор некроза опухоли альфа и гамма-интерферон;
- ED-2-макрофаги, которые проявляют противовоспалительную активность путем высвобождения ИЛ-10;

- макрофаги ED1+ED-2, которые являются источником синтазы оксида азота (NOS) [85, 318].

Дендритные клетки. Дендритные клетки (ДК) – антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые являются толерогенными, т.е. способствуют поддержанию иммунологической толерантности в тканях яичка, главным образом вызывая активацию Treg-клеток в ответ на нормальные антигены сперматозоидов [68]. Кроме того, в активированных ДК была обнаружена индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО), которая катализирует метаболизм триптофана и выработку кинуренина, что способствует укреплению иммунной привилегии [352]. Фактически кинуренин, действуя как лиганд арилуглеводородных рецепторов на поверхности T-клеток, вызывает продукцию Foxp3+ Treg-клеток [68]. Было показано, что ИДО индуцирует активацию Treg-клеток в злокачественных опухолях и беременной матке, которые, как и яичко, являются привилегированными тканями [257].

При патологических состояниях у мужчин с азооспермией ДК яичка способны активировать аутореактивные T-клетки, повышая уровень костимулирующих молекул, провоспалительных цитокинов и основного комплекса гистосовместимости класса II (МНС-II), что приводит к мужскому бесплодию.

T-лимфоциты. Treg-клетки были обнаружены в яичках мышей, крыс и человека, у которых они находятся в регионарных лимфатических узлах, взаимодействуя таким образом с тканеспецифичными аутоантигенами. Treg-клетки выполняют ингибирующую функцию, защищая сперматозоиды от аутоиммунных реакций. В связи с этим у пациентов с мутацией гена аутоиммунного регулятора, связанной с дефектом Treg-клеток, развивается хроническое воспаление яичек.

Получены доказательства того, что при хроническом воспалении яичка у мужчин с азооспермией количество Foxp3+ Treg-клеток снижается одновременно с увеличением субпопуляции провоспалительных T-клеток – T-хелперов 17-го типа. Было показано, что при экспериментальном аутоиммунном орхите у крыс количество CD8⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ и CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ и Treg-клеток

увеличивается на ранней стадии, в то время как субпопуляция последних уменьшается с переходом заболевания в хроническую фазу [295].

Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что Treg-клетки играют чрезвычайно важную роль в предотвращении органоспецифичных аутоиммунных реакций и поддержании иммунной привилегии в ткани яичек.

T-хелперы 1-го типа, по-видимому, также необходимы для обеспечения иммунного гомеостаза в яичках, однако чрезмерная активация этих клеток может способствовать развитию аутоиммунного орхита. Подтверждено прямое участие T-хелперов 17-го типа в патологическом процессе на поздней стадии аутоиммунного орхита, которое приводит к дисфункции Treg-клеток, а также способствует нарушениям структуры яичек и сперматогенеза [295].

Доля цитотоксических T-лимфоцитов (CD8+-клеток) в ткани яичек в два раза выше по сравнению с T-хелперами [295]. Тестикулярные CD8+-клетки функционально связаны с резидентными макрофагами или клетками Лейдига и отвечают за выживаемость трансплантата [147].

Также следует отметить взаимосвязь между T-лимфоцитами, клетками Лейдига и КС. Клетки Лейдига образуют интерстициальную ткань между семенными канальцами и являются основным источником T-лимфоцитов [296]. В экспериментах на культурах клеток было выявлено подавляющее действие клеток Лейдига на T-лимфоциты, в том числе за счёт связывания указанных клеток друг с другом посредством молекул сосудистой адгезии. Рецепторы андрогенов экспрессируются на T-клетках, что означает возможность модуляции их функции под действием половых гормонов, вырабатываемых в клетках Лейдига [332].

В экспериментах установлено, что снижение уровня T-лимфоцитов под действием этандиметансульфоната приводит к образованию сперматогенной гранулёмы в придатке яичка и накоплению CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток, которое может быть устранено добавлением тестостерона. В исследованиях на крысах было показано, что замещение T-клеток сопровождается подавлением развития экспериментального аутоиммунного орхита за счёт увеличения количества Treg-клеток [64].

Клетки Лейдига способны прямым или косвенным образом ограничивать проникновение Т-клеток в ткани яичка. Предназначение КС, выступающих в роли «иммунологических стражей», заключается в обеспечении нормального сперматогенеза. В связи с этим представляется, что КС способствуют дифференцировке толерогенных ДК и Treg-клеток [106]. Следует отметить, что КС также действуют в качестве факультативных АПК, экспрессируя молекулы МНС-II и тем самым опосредуя экспансию Foxp3+ Treg-клеток [213, 300]. В целом можно полагать, что КС не только образуют ГТБ, но и осуществляют контроль деструктивных реакций с участием Т-клеток [300].

ТК, также известные как мастоциты или лаброциты, являются неотъемлемым компонентом ткани семенника, что предполагает их регуляторную роль в поддержании тестикулярного гомеостаза [35, 80]. ТК экспрессируют широкий спектр рецепторов, таких как FcεRI, Feγ, рецепторы комплемента, цитокинов, хемокинов, гормонов и толл-подобные рецепторы. Это позволяет ТК синтезировать разнообразный и широкий спектр биологически активных продуктов [192, 251]. Показано, что продуцируемые ими ИЛ-1 и 6, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) играют важную роль в развитии и функционировании яичек млекопитающих, оказывая влияние на дифференциацию клеток сперматогенного эпителия и стероидогенез в физиологических условиях, участвуя в апоптозе половых клеток в нормальном семеннике [278, 330]. Известно, что ТК формируются из гемопоэтических клеток-предшественников, но при этом зрелые ТК обычно не циркулируют в крови. Они мигрируют в периферические ткани, где приобретают свой зрелый фенотип [172]. Этому процессу, а также локальному созреванию и активации ТК способствует фактор стволовых клеток (SCF), продуцируемый различными клетками, включая фибробласты и эндотелиальные клетки [76, 120].

Мужское бесплодие часто сопровождается увеличением ТК в семеннике и наблюдается отчетливая отрицательная корреляция между такими показателями, как количество ТК и состояние сперматогенеза [80]. ТК обладают потенциалом для нарушения функции яичка в условиях иммунной активации за счет

содержания медиаторов воспаления, сериновых протеаз и цитокинов [190, 330]. При этом ТК могут влиять не только на процессы расстройств сперматогенеза, но и способствовать развитию фиброза и хронических воспалительных реакций в семеннике, а также оказывать влияние на репаративную регенерацию тестикул [356]. При этом, как показано в работе Храмцовой Ю.С. и др. (2019), при экспериментальном моделировании травмы семенника наблюдается усиление функциональной активности ТК, но при этом увеличение количества ТК в органе происходит только при сохранении гематотестикулярного барьера [35].

К настоящему времени получены данные о повышенном содержании ТК как в эякуляте, так и непосредственно в тканях репродуктивных органов у бесплодных мужчин, особенно при идиопатической азооспермии. Так, анализ образцов семенной жидкости бесплодных мужчин с астенозооспермией показал, что количество ТК у этих пациентов было больше, чем у здоровых мужчин [356]. ТК представляют собой перспективную мишень для диагностики и терапии нарушений сперматогенеза, ассоциированных с иммунными и фибротическими процессами [80, 193]

1.3 Микробиом репродуктивной системы и влияние дисбиоза на репродуктивную функцию

Вопреки принятым ранее представлениям, согласно которым бактерии расценивались исключительно как патогенные микроорганизмы, современные исследования продемонстрировали, что в человеческом теле бактерий больше, чем собственных клеток. Этот факт согласуется с данными о том, что почти все органы и системы содержат сопутствующую микробиоту, состоящую из бактерий, грибов и вирусов, гармонично сосуществующими с человеком. Эти микроорганизмы играют ключевую роль в регуляции функций организма и поддержании гомеостаза [273].

В составе микробиоты могут возникать нарушения, называемые дисбиозом. Они могут быть ассоциированы с дисбалансом в составе микробной популяции,

потерей полезных симбионтов, размножением патобионтов или условно-патогенных микроорганизмов, а также нарушениями межмикробных взаимодействий [313]. Изменения микробиоты могут приводить к возникновению или обострению различных заболеваний [314].

Новые возможности для исследования микробиома человека открыли методы секвенирования нового поколения (Next-generation sequencing, NGS), которые позволили обнаружить ранее неизвестные комменсальные и патогенные микроорганизмы. С использованием этой технологии был реализован проект «Микробиом человека» («Human Microbiome Project»), который охарактеризовал микробиомы различных органов человеческого организма. Согласно данным, полученным в ходе реализации этой инициативы, на микробиом урогенитального тракта приходится около 9% от общей микробиоты человеческого организма [23].

Внедрение Максамом и Гилбертом метода терминации химических цепей для секвенирования ДНК в 1977 г., а также представленный в том же году метод Сэнгера, способствовали значительному прогрессу медико-биологических наук. Применение этих методов обеспечило возможность секвенирования более крупных геномов, кульминацией их применения стал проект «Геном человека». В качестве следующего шага были реализованы крупномасштабные проекты секвенирования для изучения вариации последовательности генома человека. Однако для проектов такого типа секвенирование по методу Sanger было слишком трудоемким, длительным и дорогостоящим.

Несмотря на высокую производительность у этих технологий имеется ряд недостатков. Одним из основных ограничений является их относительно короткая длина прочтений. Геномы часто содержат многочисленные повторяющиеся последовательности, которые длиннее, чем считывает NGS, что может привести к неправильной сборке и разрывам. В результате многие доступные геномы сильно фрагментированы на сотни или тысячи контигов. Кроме того, в то время как небольшие варианты, такие как вариации одного нуклеотида (SNV) и короткие индексы, могут быть точно обнаружены с помощью короткого считывания, большие структурные вариации (SV) сложнее обнаружить и охарактеризовать.

Это важный вопрос, учитывая, что SV характерны для ряда медицинских приложений. Кроме того, короткие чтения имеют ограниченную способность связывать (даже короткие) независимые вариации на одной и той же молекуле ДНК. Вызывают трудности и области с экстремальным значением GC%, поскольку они неэффективно амплифицируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [30].

Вскоре после появления NGS появились технологии TGS. Отличительными особенностями TGS являются одномолекулярное секвенирование одной молекулы (SMS) и секвенирование в реальном времени (в отличие от NGS, при этом секвенирование приостанавливается после каждого добавления нуклеотидного основания). Первая технология SMS, коммерциализированная Helicos Biosciences, напоминала секвенирование Illumina, но без амплификации. Поскольку метод был относительно медленным, дорогим и давал короткие чтения, он оказался неэффективным. Первая "истинная" технология TGS была представлена в 2011 г. компанией Pacific Biosciences (PacBio) и получила название "одномолекулярная последовательность в реальном времени" (SMRT). Совсем недавно (2014) Oxford Nanopore Technologies (ONT) ввела в действие технологию нанопорового секвенирования. Помимо отсутствия ПЦР-амплификации и процесса секвенирования в реальном времени, важной особенностью SMRT и нанопорового секвенирования является производство длинных считываний.

Технология нанопор может напрямую секвенировать РНК и идентифицировать модификации оснований РНК. Благодаря мобильности MinION и простым процедурам подготовки библиотеки образцов, технология нанопор позволила выполнить высокопроизводительное секвенирование в полевых условиях и в удаленных местах.

Тем не менее имеются перспективы дальнейшего секвенирования следующего поколения. Недостатком секвенирования на основе нанопор является высокая частота ошибок. С другой стороны, чтобы не отставать от технологии секвенирования на основе нанопор, для технологии PacBio будет важно увеличить

общую длину считывания и пропускную способность данного метода секвенирования [26].

1.3.1 Роль микробиома семенной жидкости в репродукции человека

Богатство микробиома семенной жидкости человека, на которое всё чаще обращают внимание исследователи, играет важную роль в поддержании мужского репродуктивного здоровья [18, 143]. Так, в работе Жабина С.Г. с соавт. (2015) было продемонстрировано, что уровень фрагментации ДНК сперматозоидов, являющийся одним из ключевых предикторов фертильности, имеет обратную корреляцию с подвижностью сперматозоидов и может служить дополнительным критерием при оценке репродуктивного потенциала эякулята [29]. Согласно ряду исследований, качество спермы напрямую зависит от наличия и состава микрофлоры в плазме крови. Установлено, что в семенной жидкости, как правило, преобладают лактобактерии, обеспечивающие подвижность и жизнеспособность сперматозоидов [6, 53]. Насыщенная ими сперма характеризуется более высоким уровнем качества, чем та, в которой преобладают другие виды бактерий. Доказано ухудшение качества семенной жидкости и увеличение общей частоты неблагоприятных репродуктивных исходов у пациентов, в образцах эякулятов которых присутствовали представители *Proteobacteria*, *Anaerococcus* и *Bacteroides* (*Bacteroides ureolyticus*), что позволяет предположить, что состав микробиоты семенной жидкости играет критически важную роль в мужском репродуктивном здоровье [3, 70, 203].

В прежние годы господствовало представление о микробиоте семенной жидкости, как деривате микробиоты вышележащих отделов урогенитального тракта. Позднее, однако, было выдвинуто широко распространённое на сегодняшний день предположение о том, что она может быть привнесена из других органов и тканей, и в том числе из кишечника, ротовой полости, крови или влагалища [10]. Современные молекулярно-генетические методы анализа позволяют детально охарактеризовать таксономический состав микробиоты у

пациентов с различными репродуктивными нарушениями. Структура микробиоты эякулята у инфертильных мужчин с различными видами азооспермии имеет значимые отличия от таковой у фертильных доноров, что подтверждает ассоциацию между дисбиотическими изменениями микробиома семенной жидкости и нарушением фертильности [32].

Бактерии способны влиять на функциональное состояние сперматозоидов путём непосредственной адгезии на поверхности их мембран или косвенно, подавляя их активность, за счёт выделения метаболитов [202].

Обмен микробиотой половых путей, происходящий между мужчиной и женщиной при незащищённом половом контакте, способствует тому, что перенос бактерий, содержащихся в семенной жидкости мужчины, может повлиять на репродуктивное здоровье пары [203]. Исследования показали, что хотя в норме половой акт не изменяет сложившийся видовой состав сообществ микробиоты партнёров, он, тем не менее, увеличивает разнообразие штаммов *Gardnerella vaginalis* у молодых женщин в отсутствие или при наличии у них симптомов бактериального вагиноза (БВ). Это явление иллюстрирует возможность переноса как бактерий комменсалов, так и потенциальных патогенов половым путем [7, 9, 28, 319].

Так, частые половые контакты и случайные партнёры могут стать причиной колебаний состава микробиоты влагалища, приводящих к рецидивам БВ. В то же время авторам ряда работ так и не удалось подтвердить этот факт. Хотя бактериальный вагиноз (БВ) традиционно ассоциируется с половым путем передачи, патогенетически он представляет собой дисбиотическое состояние, при котором частота и число половых партнеров являются значимыми факторами, модулирующими течение патологического процесса. Состав микробиома пениса мужчины с высокой точностью позволяет прогнозировать бактериальный вагиноз у его сексуальной партнерши.

Установлено, что отцовский микробиом способен видоизменять микробиом семенной жидкости представителей следующих поколений [244]. Предположительно, его состав влияет на эпигенетику потомства, в частности, на

метилование ДНК и транскриптом клеток различных тканей, вызывая стойкие изменения фенотипа потомков [114]. Помимо этого, наблюдаются и потенциально значимые изменения в работе иммунной системы. В частности, одно из исследований продемонстрировало, что длительное воздействие на женщину спермы её постоянного партнера благоприятно действует на продукцию регуляторных Т-лимфоцитов (Т-супрессоров), угнетая антифетальные иммунные реакции [280]. К сожалению, механизмы, лежащие в основе этого явления, остаются практически не изученными.

1.3.2 Микробиом секрета предстательной железы

Предстательная железа (простата) – крупнейшая железа мужской половой системы, играющая чрезвычайно важную роль в поддержании фертильности. Простатическая жидкость не только влияет на эякуляцию, активацию сперматозоидов и капацитацию, но и стимулирует изменения компонентов женского репродуктивного тракта, подготавливая его к зачатию [117, 156]. Наличие в секрете предстательной железы (ПЖ) соматически здорового мужчины микробиоты само по себе остается предметом дискуссии урологов-андрологов, однако количество исследований по данному вопросу крайне ограничено, что в свою очередь отчасти обусловлено сложностью получения образцов простатической жидкости от пациентов, анамнез которых не отягощен патологией ПЖ [74, 324].

Сравнительно недавно Feng Y. et al. (2019) при помощи интегрированного метагеномного и метатранскриптомного анализа обнаружили колонизацию ПЖ бактериями рода *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas* у пациентов с установленными диагнозами: «рак предстательной железы» и «доброкачественная гиперплазия предстательной железы» [198]. Установлено, что представители семейства *Enterobacteriaceae*, в частности *E. coli*, являются наиболее частыми возбудителями острого и хронического бактериального простатита (ХБП) [222]. Таким образом, вполне актуальной представляется

необходимость исследования взаимосвязи микробиома простатической жидкости, здорового состояния железы и проявлений её патологии. Доля бактериальных простатитов составляет около 10% случаев хронического простатита (ХП), 90% считаются абактериальными, не связанными с определенными микроорганизмами [14, 33].

В диагностике ХП ведущую роль играет посев секрета простаты (СП), от результата которого зависит дальнейшая тактика лечения больного. Высеянный бактериальный штамм считается возбудителем заболевания, если концентрация колониеобразующих единиц в секрете ПЖ или моче, полученной после массажа ПЖ, превышает концентрацию в средней или первой порции мочи в 10 и более раз.

В настоящее время активно изучается роль различных возбудителей в этиологии и патогенезе простатита [11]. По мнению некоторых авторов, существующие методики исследования микроорганизмов не отвечают современным требованиям, так как стандартный посев обнаруживает около десяти родов аэробных микроорганизмов из числа энтеробактерий, аэробных кокков и псевдомонад [22, 24]. Использование метода ПЦР в режиме реального времени тоже имеет свои недостатки из-за ограниченного определения количества микроорганизмов. Кроме того, существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению. Идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок позволяют современные молекулярные методы: электрофорез в геле, высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентной гибридизацией *in situ*, ПЦР с обратной транскриптазой, а также более доступный для практического использования метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) биотопов [5]. Современные диагностические методики для исследования биоматериала у мужчин (ПЦР, иммунотесты и технологии клеточных культур McCoу cells, 16s rRNA/DNA sequencing) позволяют идентифицировать в нем различные таксоны микроорганизмов, и в этой связи некоторые авторы в своих публикациях высказываются о возможной роли неverified инфекции при ХП [169].

Погрешности и ошибки в диагностике хронический простатит/ синдром хронической тазовой боли (ХП/СХТБ) подтверждаются тем, что в классификационной системе фенотипирования ХП/СХТБ, основанной на формировании ряда доменов UPOINTS, выделен сайт I – infection, означающий идентификацию в СП грамотрицательных микроорганизмов (предположительно, семейства Enterobacteriaceae) и/ или представителей семейства Enterococcaceae, которые, в свою очередь, являются верифицированными возбудителями ХБП [11]. Однако в данном домене не отражена облигатная принадлежность транзиторных условно-патогенных, коагулазонегативных стафилококков (КОС), неклостридиальных анаэробных бактерий (НАБ), некультивируемых микроорганизмов, вирусов и других патогенов, которые потенциально могут выступать в качестве этиологических агентов развития ХБП или ХП/СХТБ. При этом роль воспалительного процесса бактериального генеза в простате при ХП/СХТБ дискутируется [216].

В связи с этим реальная частота абактериальных форм ХП неизвестна. Недооценка внутриклеточных возбудителей и вирусов как этиологического фактора ведет к хронизации заболевания и неудачам в лечении [5]. В связи с этим некоторые авторы предлагают проводить бактериологическое исследование пациентов на расширенном наборе питательных сред в специальных условиях культивирования, масс-спектрометрию и метод амплификации нуклеиновых кислот [18, 216].

Несмотря на сходные характерные клинические проявления (так называемые простатитоподобные симптомы) ХБП и ХП/СХТБ и согласно классификации фенотипирования UPOINT (2009), основная роль придается идентификации лишь грамотрицательной (энтеробактериальной) и энтерококковой флоры – облигатных возбудителей ХБП [216].

Несмотря на расширение спектра идентифицированных микроорганизмов современными методами, остается не до конца выясненной роль конкретных таксонов микроорганизмов в развитии простатита. При этом экспериментальное моделирование простатита на кроликах New Zealand с использованием низких

титров патогенов при инфицировании *S. haemolyticus*, *E. coli* (в качестве контроля) и *Peptococcus niger* показало разную степень развития воспалительного процесса в простате [11]. Авторы на основании результатов эксперимента выявили вероятностную облигатную причастность некоторых таксонов микроорганизмов к развитию простатита, в частности *Peptococcus niger*, которые могут индуцировать и поддерживать развитие воспалительного процесса и выступать триггером активации и инициации воспалительных изменений, протекающих по «порочным кругам» даже после элиминации бактерий посредством иммунной клеточной реакции [11].

Таким образом, в целом у пациентов с хроническим абактериальным простатитом (ХАП) выявляется разнообразная микробиота. Не у всех больных ХАП выявлено достоверное повышение уровня микроорганизмов по сравнению с контрольной группой, что, на наш взгляд, указывает на неполноценную верификацию многих существующих микроорганизмов методом ГХМС или высокую степень иммунной защиты организма на момент исследования, несмотря на клинические проявления заболевания. В этой связи следует, по-видимому, согласиться с мнением Когана М.И. и др. (2020) о том, что простата не является стерильным органом [11]. Определение роли различных таксонов микроорганизмов в развитии релевантного воспалительного процесса, а также разделение облигатных уропатогенов и транзитной резидентной флоры позволят пересмотреть представленные в различных исследованиях данные по распространенности ХП, что в итоге изменит подходы к диагностике и терапии заболевания и потребует пересмотра классификации NIH-NIDDK (1995).

1.3.3 Состав микробиоты яичек и ее функции

Утверждению, согласно которому ткани яичек характеризуются наличием иммунной привилегии, противоречат доказательства возможности колонизации половых желез некоторыми видами бактерий. В биоптатах яичек пациентов с азооспермией были обнаружены представители Actinomycetota, Bacteroidota,

Bacillota и Pseudomonadota. Более того, микроорганизмы типов Bacillota, Actinomycetota, Bacteroidota, а также родов Blautia, Clostridium и Prevotella выявлены в образцах ткани яичек мужчин, страдавших бесплодием [46].

У пациентов с различными нарушениями состава спермы и здоровых доноров были идентифицированы лактобактерии, Pseudomonas, Prevotella, а также представители типов Pseudomonadota, Bacillota, Actinomycetota, Bacteroidota и Fusobacteria, причём число бактерий рода Prevotella было обратно пропорционально концентрации сперматозоидов, в то время как присутствие псевдомонад коррелировало с подвижностью сперматозоидов [51, 298].

Несмотря на обнаружение микробиоты в ткани яичек, её функция в этом органе все ещё окончательно не установлена. Относительно недавно было установлено, что микробиота яичек, по-видимому, способствует увеличению количества гамма-дельта-Т-клеток, вырабатывающих ИЛ-17, в период полового созревания, таким образом участвуя в осуществлении иммунологического контроля в половых железах [233].

Следует отметить, что актуальные исследования в этой конкретной области были сосредоточены на связи между микробиотой кишечника и микробиотой яичек. Так, в экспериментальных исследованиях на модели рыбок данио *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Plesiomonas* spp. были обнаружены как в кишечнике, так и в тканях яичка [119]. В рамках той же модели избыточное количество жиров в рационе приводило к резкому сокращению численности видов *Vibrio* и *Plesiomonas*, что вызывало нарушение механизмов передачи сигналов, транспорта аминокислот и метаболизма [337].

Установлено, что микробиота яичек участвует в регуляции сигнальных механизмов, связанных с витамином К и витамином А, а изменение её состава может приводить к нарушениям структуры внеклеточного матрикса, что в итоге вызывает развитие мужского бесплодия [138, 336]. В ходе дальнейших исследований по этому направлению были представлены доказательства того, что дефицит витамина А изменяет ось «кишечник–яички» в модели метаболического

синдрома, что в конечном счёте приводит к нарушениям сперматогенеза [301, 318, 353].

Наличие оси «кишечник–яички» подтверждается экспериментальными данными. Трансплантация фекальной микрофлоры от мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, нормальным мышам приводила к увеличению количества бактерий типа *Bacteroidota* и рода *Prevotella* у нормальных мышей с последующим развитием воспаления кишечника и эндотоксикоза, и, в особенности, нарушений сперматогенеза [121].

У мужчин бесплодие характеризуется отрицательной корреляцией между присутствием представителей *Bacteroidota* и *Prevotella* и жизнеспособностью сперматозоидов, что легло в основу гипотезы «дырявого кишечника». Согласно этой теории, кишечные эндотоксины могут препятствовать синтезу тестостерона в клетках Лейдига, тем самым провоцируя уменьшение количества сперматозоидов [315]. Установлено, что эндотоксины, связываясь с рецепторами TLR-4, экспрессируемыми на поверхности иммунных и эпителиальных клеток, могут активировать сигнальный путь NF-κB и вызывать массивное высвобождение провоспалительных цитокинов [155, 342]. В свою очередь, цитокины стимулируют ксантинооксидазу, способствуя таким образом повышению уровня активных форм кислорода и развитию оксидативного стресса [252, 281].

Андрогены или другие коммуникационные факторы, выделяемые яичками, изменяют микробиоту кишечника. В свою очередь микробиота кишечника может влиять на функцию яичек [320].

Воспаление, опосредованное транслокацией бактерий из просвета кишечника, может быть причиной повреждения эндотелия, нарушений функции ГТБ, а также расстройства сперматогенеза и снижения жизнеспособности сперматозоидов [52, 305]. Кроме того, ДК и макрофаги, которые инфильтрируют придаток яичка, способны фагоцитировать сперматозоиды, тем самым способствуя нарушению сперматогенеза [151]. Другая ассоциация между кишечной микробиотой и мужской репродуктивной системой представлена

опосредованной эндотоксинами инсулинорезистентностью, развивающейся вследствие измененной проницаемости кишечника [146].

Инсулинорезистентность является состоянием, имеющим патогенетическое значение, поскольку её возникновение способствует как изменению микробиоты кишечника, так и нарушениям сперматогенеза. При изучении моделей бесплодия с инсулинорезистентностью была выявлена более высокая концентрация *Saccharibacteria* и более низкие уровни *Actinomycetota* и *Verrucomicrobia* по сравнению с контрольной моделью без инсулинорезистентности [110]. Также усиление инсулинорезистентности ассоциировано со снижением секреции тестостерона клетками Лейдига, в том числе за счёт уменьшения выделения гонадотропных гормонов [220].

Появляется все больше доказательств того, что изменения структуры микробного сообщества тестикулярной ткани является ключевыми факторами не только репродуктивного здоровья, но и связанных с ним заболеваний. Дисбиоз микробиома репродуктивного тракта может вызывать репродуктивную физиологическую дисфункцию и вызывать сопутствующие заболевания и неблагоприятные исходы беременности [130, 267].

До недавнего времени считалось, что моча и сперма здорового мужчины не содержат бактерий или что бактерии присутствуют лишь изредка [202]. Однако, молекулярная диагностика позволила обнаружить многочисленные бактерии и вирусы в моче и сперме здоровых мужчин. В частности, современные лабораторные технологии, такие как NGS, позволили проводить тщательный анализ сложных микробных сообществ в различных областях человеческого тела, в том числе и репродуктивной системе [47].

Использование методов секвенирования при анализе спермы показало, что человеческая сперма не стерильна и содержит специфическую флору, функции которой еще полностью не изучены. Кроме того, неясно происхождение этих микроорганизмов [202].

Одной из важнейших проблем в изучении структуры микробиома тестикул является ограниченность наших знаний об этих микробных сообществах. В целом

неясно, как формируется и поддерживается бактериальный спектр репродуктивного тракта. Более того, существует лишь несколько исследований относительно роли, которую они могут играть в организме хозяина и функциональных репродуктивных процессах. Сравнение бактериальных сообществ, обнаруженных при секвенировании 16S рРНК в сперме, моче и мазках из прямой кишки здоровых мужчин, показало, что только 2,3% идентифицированных таксонов были общими для этих трех сред и 10% для спермы и мочи [119]. Расширение диапазона применений этих данных привели к значительному увеличению объема знаний о различных биологических объектах, в частности позволили изучить целые микробные сообщества в образцах и оценить их взаимодействие и влияние на сперматозоиды.

В настоящее время публикуется большое количество исследований о связи между микроорганизмами и мужским бесплодием, однако микробиом тестикулярной ткани изучен недостаточно в сравнении с другими системами и органами. Поэтому разработка новых биомаркеров мужского бесплодия имеет решающее значение для улучшения диагностики и прогноза этого заболевания [272].

По данным Alfano M. et al. (2018), 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. Такие отличия могут быть следствием различий в культуре, образе жизни и кулинарных традициях. В микробиоте ткани яичка пациентов обеих групп чаще всего встречались представители семейства Lactobacillaceae: в первой группе в 87,5% случаев, а во второй группе в 54,3% [298]. Известно, что у здоровых женщин преобладают бактерии Lactobacillus которые выполняют множество защитных функций, оказывают влияние на естественную беременность [238] и результаты экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [338]. В мужской микробиоте Lactobacillus могли оказывать влияние на параметры качества спермы.

Установлено, что медиаторы воспаления могут напрямую вызывать

фрагментацию ДНК в сперматозоидах, что в конечном итоге ограничивает способность зародышевых клеток к оплодотворению [78, 231].

Ряд работ посвящен оценке влияния бактериальных сообществ на свои экологические ниши посредством своей метаболической активности, в частности, в настоящее время является общепризнанным, что нормальный уровень pH влагалища женщины обеспечивается благодаря активности лактобактерий, что защищает от вагинальных инфекций [227].

В целом полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что здоровый микробиом уретры прост, стабилен и может быть связан с воздействием окружающей среды, однако таксономическое разнообразие в большинстве проведенных к настоящему времени исследований было низким [275]. Очевидно, что изменение микробного состава может привести к дисбиозу, который, в свою очередь, может влиять на фертильность и макроскопические нарушения показателей спермы. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что у генетически восприимчивого хозяина дисбаланс взаимодействий микробиоты и иммунной системы в определенных условиях окружающей среды способствует патогенезу различных иммуноопосредованных нарушений, приводящих к репродуктивным потерям. Изменения в микробиоте половых путей оказывают специфическое влияние на репродуктивную систему, а коррекция аномальных микробиомов может привести к улучшению репродуктивных результатов.

1.4 Особенности мужского бесплодия, опосредованного изменениями состава микробиоты

Несмотря на значительный прогресс в исследованиях микробиома, изучение микрофлоры мужских половых путей всё ещё находится на начальном этапе. Большинство работ, касающихся мужской репродуктивной микробиоты, сосредоточены на изучении микробиома семенной жидкости, в состав которой входит секрет яичек, придатков яичек, простаты, семенных пузырьков,

бульбоуретральных и парауретральных желез. Такая среда содержит питательные вещества для микроорганизмов, обеспечивая благоприятные условия для их развития [103, 105, 249]. Таким образом, микробиом семенной жидкости отражает состав микрофлоры всей мужской половой системы.

Частота выявления мужского фактора в бесплодных парах достигает 50%, при этом важнейшим этиологическим фактором является инфекция мочеполовых путей [102-104, 105, 249, 263, 283]. У 25% мужчин, имеющих аномальные показатели спермограммы, устанавливают диагноз идиопатического бесплодия, так как современные диагностические инструменты не позволяют выявить его причины [79, 168, 180].

Современное определение мужского бесплодия, предложенное Esteves S.C. и Humaidan P. (2023), рассматривает его как заболевание мужской репродуктивной системы, обусловленное врождёнными и генетическими состояниями, анатомическими, эндокринными, функциональными или иммунологическими нарушениями, инфекциями мочеполового тракта, онкологическими заболеваниями и их лечением, а также сексуальными расстройствами. При этом подчёркивается модулирующее влияние неадекватного образа жизни, воздействия токсикантов и пожилого отцовского возраста, которые могут самостоятельно или потенцировать действие известных причинных факторов [104].

Современное определение мужского бесплодия, предложенное Esteves S.C. и Humaidan P. (2023), рассматривает его как заболевание мужской репродуктивной системы, обусловленное врождёнными и генетическими состояниями, анатомическими, эндокринными, функциональными или иммунологическими нарушениями, инфекциями мочеполового тракта, онкологическими заболеваниями и их лечением, а также сексуальными расстройствами. При этом подчёркивается модулирующее влияние неадекватного образа жизни, воздействия токсикантов и пожилого отцовского возраста, которые могут самостоятельно или потенцировать действие известных причинных факторов [104].

Известны традиционные механизмы, посредством которых патогенные бактерии могут негативно влиять на мужскую фертильность: нарушать подвижность и капациацию сперматозоидов, индуцировать оксидативный стресс и апоптоз [102, 103, 137, 185, 200, 263, 283, 326]. Некоторые исследователи полагают, что дисбиоз семенной жидкости также может оказывать неблагоприятное воздействие на мужскую фертильность посредством дополнительных, но пока ещё не выясненных механизмов.

Несмотря на наличие ГТБ, механизмов иммунной защиты яичек и локальной микробиоты, в семенники могут проникать патогенные микроорганизмы из мочеиспускательного канала и бактерии, вызывающие заболевания, передающиеся половым путём. Острый эпидидимит является весьма часто наблюдаемым проявлением инфекции мужских половых путей; пораженный при этом заболевании орган имеет структуру, во многом совпадающую со строением яичек. Ткани придатка яичка являются менее иммунологически привилегированными структурами по сравнению с тканями яичек, при этом головка придатка характеризуется определённой степенью иммунной реактивности, а ткани хвоста придатка могут иметь воспалительный профиль [160].

У пациентов с эпидидимитом регистрируется очень низкое качество спермы, которое заключается в изменении белкового состава сперматозоидов, что приводит к мужскому бесплодию [129]. Стойкое повреждение под действием патогенных микроорганизмов приводит к фиброзной трансформации и дегенерации эпителия придатка яичка.

В экспериментальных исследованиях было показано, что инфицирование грамотрицательными и грамположительными бактериями приводит к развитию выраженного провоспалительного цитокинового ответа, сопровождавшегося повышением уровня NOS-2 в семенниках мыши [83, 219]. Уропатогенные инфекции, вызванные *E. coli*, у мышей характеризуются активацией toll-like receptors (TLR)4 и TLR5 в головке придатка яичка с высвобождением провоспалительных цитокинов и интерферона 1-го типа [100].

Chlamydia trachomatis является наиболее частым возбудителем заболеваний, передающихся половым путём и приводящих к хроническому воспалению и фиброзу полового тракта у мужчин [343]. Антигены *Chlamydia trachomatis* связываются с рецепторами TLR2 и TLR4, а также рецепторами распознавания патогенов, что сопровождается массивным высвобождением провоспалительных цитокинов; это, в свою очередь, может обуславливать переход процесса в хроническую стадию. Что касается вирусных заболеваний, то РНК-вирус эпидемического паротита является наиболее частой причиной эпидидимита и орхита, которые вызывают мужское бесплодие [140].

Имеются сообщения о том, что COVID-19 может инфицировать ткани яичка, нарушая секрецию тестостерона, тем самым приводя к первичному гипогонадизму или усугубляя ранее существовавшее снижение уровня мужских половых гормонов [72]. В частности, у пациентов с COVID-19 было обнаружено сниженное количество клеток Лейдига наряду с высокой экспрессией ангиотензинпревращающего фермента 2 в яичках [219, 232, 355]. Кроме того, сообщалось о вовлечении Т- и В-лимфоцитов тестикул в инфекционный процесс при COVID-19 [149].

Результаты исследований влияния микробиомов различных отделов половой системы и пробиотиков на мужскую репродуктивную функцию представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Влияние микробиома и пробиотиков на репродуктивную функцию у мужчин

Микроорганизмы	Орган-мишень (секрет)	Основные эффекты	Ссылки
<i>Anaerococcus</i>	Сперма	Маркер низкого качества спермы	[203]
<i>Proteobacteria</i>	Сперма	Увеличивает вязкость семенной жидкости	[70]
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i>	Сперма	Сохраняют сперматозоиды подвижными и защищают их от действия активных форм кислорода	[93]

Продолжение таблицы 1.1

Микроорганизмы	Орган-мишень (секрет)	Основные эффекты	Ссылки
L. rhamnosus PB01	Сперма	Повышает подвижность сперматозоидов и улучшает их кинематические параметры (в эксперименте на мышах)	[176]
L. L.rhamnosus CECT8361, Bifidobacterium longum CECT7347	Сперма	Улучшение подвижности сперматозоидов и снижение степени фрагментации ДНК	[239]
L. casei CGMCC 1.570	Сперма	Повышение подвижности сперматозоидов и уровня активности их митохондрий на фоне повреждения, связанного с инвазией Pseudomonas aeruginosa (в эксперименте на свиньях)	[123]
L. rhamnosus CECT8361, Bacteroidetes longum CECT7347	Сперма	Облегчает негативное воздействие окислительного стресса	[44]
Трансплантация фекальной микробиоты	Яички	Улучшение качества спермы и сперматогенеза (в эксперименте на мышах)	[157]
Clostridium Tyrobutyricum	Яички	Повышение проницаемости ГТБ (в эксперименте на мышах)	[311]
L. acidophilus, Saccharomyces cerevisiae	Яички	Повышение уровня тестостерона, количества и веса особей в приплоде (в эксперименте на кроликах)	[306]
L. plantarum TW1-1	Яички	Восстановление тестикулярной функции после ДЭГФ-индуцированного повреждения (в эксперименте на мышах). ДЭГФ – диэтилгексилфталат (ДОФ – диоктилфталат)	[175]
Препарат PRO-Men Hyperbiotics	Предстательная железа	Снижение выраженности воспалительного процесса при рецидивирующем простатите	[122]

1.5 Дисбиоз яичек и его взаимосвязь с мужским бесплодием

В последние годы было начато изучение взаимосвязи дисбиоза в яичках с мужским бесплодием. Были оценены ассоциации различных нарушений состава спермы, включая олиго-азооспермию, астено-азооспермию и азооспермию, с характеристиками микробного состава семенной жидкости. К примеру, было установлено, что у лиц с азооспермией увеличивается количество бактерий типов *Bacteroidota* и *Bacillota*, в то время как число представителей псевдомонад и актиномицетов снижается [220]. У пациентов с олиго-астено-тератозооспермией, напротив, очень высока частота обнаружения микроорганизмов родов *Neisseria*, *Klebsiella* и *Pseudomonas*, а также типа *Bacillota*, но количество представителей *Lactobacillus* более низкое [142]. У пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией было выявлено снижение численности бактерий рода *Clostridium*.

Интенсивно изучается и влияние микробиоты женских половых путей на состав микрофлоры у мужчин. Например, *Gardnerella vaginalis* и бактерии рода *Lactobacillus* были обнаружены в семенниках мужчин молодого возраста, в то время как микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium* и *Acidovorax* были выявлены в семенной жидкости пожилых людей [70, 277]. Изменения состава спермы воспалительного характера были ассоциированы с выявлением *Streptococcus agalactiae*, *Gardnerella vaginalis* и бактерий, которые обнаруживаются при бактериальном вагинозе [89].

1.6 Состав микрофлоры семенной жидкости и снижение фертильности у мужчин

1.6.1 Методы оценки микробиома

Первоначально исследования бактериального состава семенной жидкости основывались на использовании культуральных методов, ориентированных преимущественно на выделение хорошо известных патогенных бактерий, таких

как *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, и *Ureaplasma* [211, 262, 333]. Результаты этих исследований позволяли получить весьма ограниченное представление о микробиоте семенной жидкости, особенно о наличии в ней анаэробов и других микроорганизмов, которые сложно выращивать. С течением времени получили распространение методы, основанные на использовании полимеразно-цепной реакции (ПЦР), которые позволили выявить более широкий спектр микроорганизмов. Однако, их результаты также не смогли продемонстрировать исчерпывающую картину микробиома семенной жидкости [221]. Ограничения были связаны с тем, что исследования, основанные на ПЦР, предполагали заблаговременное определение родов исследуемых бактерий – таким образом, эти методы малоэффективны в отношении исследования полимикробных образцов.

Появление технологии NGS обеспечило значительный прогресс в изучении микробиома человека. Этот подход позволяет непосредственно секвенировать ДНК и РНК микроорганизмов без необходимости их культивирования. Двумя основными методами NGS, применяемыми для определения характеристик микробиома, являются ампликонное секвенирование и метагеномное секвенирование методом «дробовика» [53, 82].

Ампликонное секвенирование основано на амплификации определённого участка ДНК с помощью ПЦР и последующем секвенировании полученного материала. Как правило, это влечёт за собой нацеливание на один или несколько гипервариабельных участков гена бактериальной 16S рибосомной РНК (рРНК). Гипервариабельные участки, которые у бактерий имеют высокую степень консервативности и широкое распространение, представляют собой подходящую основу для анализа [41]. Тем не менее, из-за практических ограничений, связанных с продолжительностью выполнения метода и его высокой стоимостью, для секвенирования обычно выбирается только часть этих вариабельных участков. Такой подход чреват получением необъективных результатов, поскольку ни один участок рРНК не может служить основанием для эффективного распознавания всех видов бактерий, а секвенирование конкретных

гипервариабельных последовательностей может привести к ложным результатам.

В отличие от ампликонного секвенирования, метагеномное секвенирование методом «дробовика» (shotgun metagenomic sequencing, SMS) позволяет всесторонне оценить все последовательности ДНК в исследуемом образце. В процессе исследования вся ДНК образца извлекается и подвергается случайной фрагментации с последующим баркодированием и нанесением адаптеров на каждый фрагмент, что облегчает дальнейшую идентификацию образцов и секвенирование ДНК. Полученные данные обрабатываются и сопоставляются со справочной базой данных для идентификации таксонов и оценки их функционального потенциала [41].

В отличие от ампликонного секвенирования, метод SMS позволяет обнаруживать паразитов, грибы и ДНК-вирусы. Метод характеризуется высоким разрешением и чувствительностью в отношении выявления видовой структуры микроорганизмов [41].

В последние годы в клинико-лабораторную практику активно внедряется метод транскриптомного секвенирования РНК. Транскриптом определяется как совокупность всех РНК, присутствующих в определенной ткани или организме в определенный момент времени. Проводится изучение полного набора транскриптов РНК, произведенных геномом, для получения представления об уровне экспрессии РНК. Анализ уровня транскрипции и экспрессии РНК, функции и структуры транскриптов из различных образцов (клеток или тканей) позволяет получить информацию о геномной регуляции [286, 340].

Транскриптомный анализ проводился путем исследования функции продукта транскриптома в форме РНК, состоящей из кодирующей и некодирующей РНК. Кодирующая РНК ограничена информационной РНК, в то время как некодирующая РНК состоит из нескольких типов: длинной некодирующей РНК (днРНК), рибосомальной РНК (рРНК), транспортной РНК (тРНК), малой РНК, полученной из тРНК (цРНК), кольцевой РНК (цирРНК). При транскриптомном секвенировании можно определить так называемое живое сообщество микробиома, которое активно в данный момент времени, в отличие от

таргетного и метагеномного шотган секвенирования ДНК, при выполнении которого могут выявляться следы ДНК, но при этом микроорганизм погибает. Представляется перспективным применение данного метода в отношении исследования микробиомов с низкой микробной биомассой.

1.6.2 Микрофлора семенной жидкости здоровых мужчин

По результатам анализов, выполненных с использованием указанных выше методов исследований, удалось выявить следующие особенности микробиома семенной жидкости. Во-первых, были обнаружены значительные различия в её видовом составе у разных людей. Во-вторых, была отмечена склонность к формированию микробных сообществ, в которых доминируют определённые виды [333].

В одном из первых исследований, проведённых на основе методов NGS, Nou D. et al. (2013) секвенировали участки V1-V2 генов 16S рРНК; при этом установили, что даже эякулят здоровых доноров содержит очень разнообразную популяцию бактерий. Среди микроорганизмов, наиболее распространённых в семенной жидкости, были обнаружены *Ralstonia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*. Выделенные представители микрофлоры были организованы в шесть групп, основанных на видовом составе и структуре [203].

В работе Weng S.L. et al. (2014) авторы применяли секвенирование гипервариабельной области V4 гена 16S рРНК для исследования 36 образцов эякулята с нормальной спермограммой. Наиболее распространёнными родами обнаруженных микроорганизмов были *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Gardnerella*, *Prevotella* и *Rhodanobacter*. Бактериальные сообщества сформировали три основных кластера: с преобладанием *Pseudomonas*, с преобладанием *Lactobacillus* и с преобладанием *Prevotella*. Наиболее часто встречалась группа с преобладанием *Lactobacillus* [53].

Baud D. et al. (2019) было выполнено секвенирование гипервариабельных областей V1 и V2 гена 16S рРНК в 26 образцах семенной жидкости, полученных

от мужчин, проходящих оценку фертильности, с нормальными показателями спермограммы. В результате было выделено три группы в зависимости от состава микробиоты: группа с преобладанием *Lactobacillus*, группа с преобладанием *Prevotella* и полимикробная группа. Наличие *Staphylococcus* было ассоциировано с нормальными результатами спермограммы, в то время как род *Lactobacillus* выделяли из образцов с нормальной морфологией [284].

Согласно результатам другого исследования *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Veillonella*, *Corynebacterium* и *Escherichia* являлись наиболее распространёнными видами, выделенными из эякулята мужчин с нормальной спермограммой [174, 201].

Анализ состава микробиома семенной жидкости 30 здоровых мужчин, выполненный Bukharin O.V. et al. (2022), позволил установить, что в качестве наиболее распространённых родов микроорганизмов выявляются *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Neisseria* и *Veillonella*. Результаты исследования Yao Y. et al. (2022), проанализировавших образцы семенной жидкости 20 мужчин с нормальной спермограммой, выявили такие основные роды бактерий, как *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Staphylococcus* и *Gardnerella*. Среди этой выборки мужчин наибольшей численностью обладала группа с преобладанием *Lactobacillus* [270].

Напротив, авторами в работе Monteiro C. et al. (2018) с помощью секвенирования гипервариабельных областей V3-V6 гена 16S рРНК была обнаружена низкая распространенность *Lactobacillus* и высокая частота встречаемости *Enterococcus* в образцах семенной жидкости мужчин с нормальной спермограммой. Однако важно отметить, что все образцы, которые были проанализированы в этом исследовании, представляли собой остатки материала для процедур вспомогательной репродукции, и нельзя исключить, что некоторая доля случаев бесплодия была обусловлена мужским фактором [70].

Секвенирование гипервариабельных областей V1 и V2 гена 16S рРНК применяли Yang H. et al. (2020). Было установлено, что наиболее распространёнными родами бактерий у здоровых мужчин с нормальной

спермограммой были *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Boseagenosp*, *Bosea* и *Afipia*. Авторы наблюдали повышенное содержание *Lactobacillus* в тех случаях, когда результаты спермограммы отличались от референсных значений. С учетом разнообразия микрофлюидных компонентов эякулята и сложности микробиома было определено, что около 30% микроорганизмов происходят из микробиома мочеиспускательного канала [233].

Специфические роды бактерий, такие как *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* и *Acidovorax*, обнаруживали в микробиоме семенной жидкости чаще, чем в микробиоме уретры. Этот факт позволяет предположить, что они происходят из анатомических структур, расположенных выше мочеиспускательного канала [178, 325]. Таким образом, микробиом семенной жидкости представляет собой совокупность микробиомов яичек, придатков яичка, ПЖ, семенных пузырьков и уретры.

Значительное разнообразие микробиоты кишечника, кожи и полости рта ряд авторов полагают полезным для здоровья человека. При этом данные исследований, посвящённых изучению микробиома мужских половых путей, довольно разнородны. Некоторые авторы полагают, что большое разнообразие микробиоты неблагоприятно для состояния сперматозоидов [269]. По мнению же других исследователей, снижение биоразнообразия семенной жидкости ассоциировано с плохим качеством эякулята [199, 271].

1.6.3 Микрофлора семенной жидкости мужчин с измененным качеством эякулята

В большинстве исследований, посвящённых изучению бесплодных пар, не удалось установить убедительной связи между наличием бактерий в семенной жидкости и аномальными результатами спермограммы [54, 119, 325]. Однако, по данным Ricci S. et al. (2018), в образцах с положительным результатом анализа на наличие микроорганизмов была снижена подвижность сперматозоидов. Кроме

того, авторы выявили отрицательную взаимосвязь между наличием *E. faecalis* и качеством эякулята [150].

Аналогичные результаты были получены группой Zeyad A. et al. (2018) – присутствие бактерий негативным образом сказывалось на концентрации и подвижности сперматозоидов [248]. Исследование, проведенное Pagliuca C. et al. (2021), продемонстрировало значимую корреляционную связь между инфицированностью, оцененной с помощью бактериологического исследования и ПЦР, и объемом эякулята, концентрацией сперматозоидов и их подвижностью [200].

В ряде исследований были применены методы NGS – для изучения микробиома у мужчин с аномальными результатами спермограммы. Общеизвестно, что олигозооспермия характеризуется концентрацией сперматозоидов ниже предела, установленного специалистами Всемирной организации здравоохранения – 16×10^6 сперматозоидов/мл [103, 354]. В исследовании, проведенном Okwelogu S.I. et al (2021), была выявлена связь некоторых родов бактерий с олигозооспермией. Наиболее часто встречающимися родами в таких случаях были *Prevotella*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Shuttleworth* и *Serratia* [201]. Подтверждающие это наблюдение результаты были получены в работе Lundy S.D. et al. (2021), в которой авторами была описана отрицательная связь между количеством *Prevotella* в семенной жидкости и концентрацией сперматозоидов [119].

Показано, что присутствие бактерий в эякуляте существенно влияет на подвижность – важный показатель базовой спермограммы [108]. Астенозооспермия определяется как наличие менее 30% прогрессивно-подвижных сперматозоидов или как снижение общей подвижности до уровня менее 42% [105, 354]. В работе Yang H. et al. (2020) было обнаружено, что для мужчин с астенозооспермией характерно повышенное содержание *Sneathia*, *Ralstonia*, *Ureaplasma*, *Bacteroides* и *Chryseobacterium*. Кроме этого, у пациентов с олигоастенозооспермией были распространены роды *Ralstonia*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Lachnospira* и *Phascolarctobacterium*. Примечательно и то, что

авторы выявили более высокую частоту встречаемости *Lactobacillus* у пациентов с астено- или олигоастенозооспермией, чем у мужчин контрольной группы с нормальными показателями базовой спермограммы. Эти данные позволяют рассматривать *Lactobacillus* в качестве потенциального бактериального биомаркера астенозооспермии (величина AUC ROC для данного показателя составила 0,841) [77].

Аналогичные данные были получены Yao Y. et al. (2022), обнаружившие, что у мужчин с астенозооспермией преимущественно можно встретить микробиом семенной жидкости, обогащенный *Lactobacillus*. Изучив образцы семенной жидкости мужчин, участвовавших в процедуре ЭКО, авторы отметили отрицательную связь между подвижностью сперматозоидов и выделением типов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и классов *Alphaproteobacteria*, *Sphingobacteria* [270]. Однако другое исследование дало противоположные результаты: было показано, что присутствие в семенной жидкости протеобактерий *Pseudomonas* напрямую ассоциировано с общим числом подвижных сперматозоидов [178, 325].

Олигоастенотератозооспермия характеризуется изменением трёх основных показателей спермограммы – концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов [103]. Вышеперечисленные сдвиги указывают на серьёзные нарушения сперматогенеза и ассоциированы со снижением шансов на наступление беременности естественным путём [347]. В работе Monteiro S. et al. (2018) продемонстрирована связь олигоастенотератозооспермии с присутствием цианобактерий и фузобактерий, повышенной распространённостью *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aerococcus*, *Actinobaculum* и *Neisseria*, а также со снижением частоты выявления *Lactobacillus* и *Propionibacterium* [70].

Термином азооспермия обозначается отсутствие сперматозоидов в эякуляте [285]. По результатам обследования мужчин, участвовавших в процедуре ЭКО, Okwelogu S.I. et al. (2021) обнаружили, что *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Veillonella* и *Gardnerella* являются наиболее распространёнными родами микроорганизмов у мужчин с азооспермией. Однако в указанной публикации авторы не уточняли её причину [201].

Hou D. et al. (2013) не обнаружили значимых различий в бактериальном составе семенной жидкости у здоровых доноров и у бесплодных мужчин с отклонениями в спермограмме. Однако эти авторы выявили отрицательную связь между качеством эякулята и наличием анаэрококков [203].

Weng S.L. et al. (2014) показали, что наличие микробиома с преобладанием *Prevotella* связано с низким качеством эякулята [53]. Аналогичные данные были опубликованы Vaud D. et al. (2019), продемонстрировавшие, что род *Prevotella* был в значительной степени распространён среди мужчин с аномальными показателями спермограммы [284].

Повышенная распространенность *Aerococcus* и сниженная распространенность коллинселл у бесплодных пациентов по сравнению с контрольной группой фертильных мужчин была выявлена Lundy S.D. et al. (2021). В этом исследовании мужское бесплодие определялось по наличию изменений основных параметров спермограммы и неспособности зачать ребёнка после попыток в течение 12 месяцев [249]. Bukharin O.V. et al. (2022) по результатам обследования бесплодных мужчин продемонстрировали, что *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Escherichia* были наиболее распространёнными видами микроорганизмов, выделенных из семенной жидкости [269].

Лейкоцитоспермия характеризуется наличием более 1,0 млн. лейкоцитов на 1 мл семенной жидкости [91]. Как правило, этот признак ассоциирован с инфекцией мочеполовых путей, поскольку бактериоспермия может спровоцировать увеличение количества лейкоцитов [105]. Однако и другие причины, такие, как воздействие вагинального секрета во время полового акта, курение и аутоиммунные заболевания, могут способствовать увеличению количества лейкоцитов в семенной жидкости.

По данным большинства исследований, в которых использовались стандартные культуральные методы, бессимптомное присутствие бактерий в семенной жидкости не было ассоциировано с увеличением количества лейкоцитов [150], даже в случаях минимального порогового значения для

лейкоцитоспермии – $0,2 \times 10^6$ лейкоцитов/мл [50, 268].

Некоторым авторам удалось обнаружить связь между лейкоцитоспермией и бактериоспермией [248, 328]. Так, Yao Y. et al. (2022), использовавшие методы NGS для оценки микробиома семенной жидкости, выявляли у мужчин с лейкоцитоспермией преимущественно бактериальное сообщество с преобладанием *Streptococcus*. Кроме того, авторы обнаружили связь между лейкоцитоспермией и повышенной распространенностью типа *Bacteroidetes* [270].

Исследование образцов семенной жидкости мужчин, включенных в процедуру ЭКО, выполненное Štšepetova J. et al. (2020), показало, что у таких пациентов наличие рода *Staphylococcus* было ассоциировано с лейкоцитоспермией [304]. В работе Lundy S.D. et al. (2021) было выявлено, что выявление лейкоцитоспермии имело отрицательную корреляцию с количеством бактерий рода *Aerococcus*. Тем не менее, при сравнении микробиомов семенной жидкости бесплодных мужчин с лейкоцитоспермией и без неё не было обнаружено различий по показателям бактериального разнообразия [119].

При мужском бесплодии часто отмечают признаки оксидативного стресса и фрагментация ДНК сперматозоидов, что может быть результатом активации лейкоцитов [102, 103, 263, 283, 307]. Применение методов NGS для оценки микробиома семенной жидкости мужчин с повышенным оксидативным стрессом (окислительно-восстановительный потенциал более $1,34$ мВ/ 10^6 сперматозоидов/мл) позволило Lundy S.D. et al. (2021) выявить незначительные различия в трёх таксонах – *Serratia*, *Streptococcus* и *Curvibacter* [119]. В то же время в работе, проведённой с использованием культуральных методов Zeyad A. et al. (2018), различий в уровнях фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с бактериоспермией и без неё выявлено не было [248].

По результатам масштабного исследования, в котором приняли участие почти 5000 бесплодных мужчин, выполненного Vilvanathan S. et al. (2016), была выявлена отрицательная связь между положительным результатом посева семенной жидкости и целостностью ДНК сперматозоидов [54]. Изучение образцов здоровых мужчин с нормальными показателями спермограммы,

проведённое Fraczek M, et al. (2016), показало, что повреждение ДНК сперматозоидов ассоциировано с положительными результатами посева семенной жидкости, но без увеличения маркеров оксидативного стресса [307].

Бактерии в мочеполовом тракте могут вызывать воспалительные реакции, опосредованные различными цитокинами, которые вырабатывают лейкоциты. Исходя из этого, логично предположить, что характеристики микробиома семенной жидкости могут быть связаны с продукцией медиаторов воспаления. Bukharin O.V. et al. (2022) продемонстрировали, что бактерии рода *Staphylococcus*, выделенные из семенной жидкости здоровых мужчин, разрушают ИЛ-10 и -17 более интенсивно, чем стафилококки, выделенные из эякулята бесплодных мужчин [269]. Кроме того, бактерии рода *Enterococcus*, выделенные у бесплодных мужчин, снижали уровень ИЛ-1, а представители рода *Corynebacterium*, полученные от таких пациентов, снижали концентрацию ФНО-альфа в большей степени, чем те, которые были получены от здоровых мужчин. Эти данные свидетельствуют о том, что микробиом семенной жидкости может влиять на воспалительный ответ организма, по крайней мере, локально [58]. Следует отметить, что исследования, основанные на культуральных методах, не выявили связи между присутствием бактерий и уровнем провоспалительных маркеров в семенной жидкости.

1.6.4 Изменения микрофлоры яичек и придатков яичек

Оценка микробиома придатков яичек и тестикулярной ткани требует сбора биологических жидкостей или образцов тканей из этих органов. Важно отметить, что гистологическая оценка биоптатов яичек уже давно используется в клинической практике для прогнозирования фертильности, в частности, как было показано Aafjes J.H. с соавт. (1978), полуколичественный анализ сперматогенеза в биопсийном материале имеет прогностическую ценность при олигозооспермии, однако ограниченная информативность метода при тяжёлых формах нарушения сперматогенеза требует комплексного подхода к диагностике [42]. Alfano M. et al.

(2018) было проведено исследование образцов тканей яичек пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией (иНОА) и мужчин с нормозооспермией, перенёсших орхиэктомию. Используя методы NGS для секвенирования гипервариабельных участков V3-V5 гена 16S рРНК, авторы обнаружили, что тестикулярный компартмент не являлся стерильным. В ткани яичек мужчин с нормальным сперматогенезом были идентифицированы типы Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria. Однако в образцах тестикулярной ткани, полученных от пациентов с иНОА, были обнаружены только типы Actinobacteria и Firmicutes. Исследование микробиома тестикулярной ткани у мужчин с иНОА и полной аплазией зародышевых клеток выявило снижение бактериального разнообразия. При этом доминирующим был тип Actinobacteria, а род Clostridia отсутствовал [154].

Изучение микробиомов яичек мужчин с азооспермией, тяжёлой олигоастенозооспермией или высокой степенью фрагментации ДНК было проведено Molina N.M. et al. (2021). Авторы использовали образцы тестикулярной ткани, полученные во время процедур забора семенной жидкости. Исследователи выявили низкий уровень присутствия бактерий и идентифицировали десять родов микроорганизмов, включая Blautia (тип Firmicutes), Cellulosibacter (Firmicutes), Clostridium XIVa (Firmicutes), Clostridium XIV B (Firmicutes), Clostridium XVIII (Firmicutes), Collinsella (Actinobacteria), Prevotella (Bacteroidetes), Prolixibacter (Bacteroidetes), Robinsoniella (Firmicutes) и Wandonia (Bacteroidetes). Следует отметить, что, несмотря на строгие антисептические меры, на долю контаминированных образцов пришлось 50–70% от всех проб. Этот факт свидетельствует о том, что забор материала из яичек проводился не в стерильных условиях [51].

Lundy S.D. et al. (2021) продемонстрировали, что Collinsella и Staphylococcus преобладали в образцах семенной жидкости здоровых фертильных мужчин и реже обнаруживались в образцах, полученных от мужчин, перенесших вазэктомию. Результаты этого исследования позволяют предположить, что эти два рода бактерий являются составляющими микробиома яичек и придатков. При

этом следует отметить, что сообщения о составе микробиома придатков яичек на данный момент в доступной литературе не представлены [119].

1.7 Факторы, влияющие на микробиом яичек

1.7.1 Диета и микробиом кишечника

Известно, что рацион питания, широко распространённый в экономически развитых странах, и в том числе в Российской Федерации, с высоким содержанием жиров и сахара может приводить к ожирению, нарушениям обмена веществ и изменениям в составе кишечной микробиоты [341]. Однако влияние дисбиоза, вызванного высокожировой диетой (ВЖД), на репродуктивную функцию четко не охарактеризовано. В то же время исследование, проведенное Ding N. et al. (2020), показало наличие выраженных различий в бактериальном составе кишечной микрофлоры у людей, придерживающихся нормального питания и ВЖД [155].

Существуют данные о том, что ВЖД связана со снижением численности микроорганизмов *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia* и увеличением численности представителей родов *Firmicutes* и *Proteobacteria* [314]. Было отмечено, что приверженность ВЖД приводит к снижению концентрации и подвижности сперматозоидов, а также к уменьшению количества сперматоцитов и круглых сперматид. Анализ кишечной микробиоты в группе ВЖД выявил повышенное содержание *Bacteroides*, *Prevotella*, *Rikenella* и *Lactobacillus*. Исследование образцов кала здоровых доноров и бесплодных мужчин с астенозооспермией, олигозооспермией и тератозооспермией выявило сильную отрицательную корреляцию между подвижностью сперматозоидов и общим количеством *Bacteroides* и *Prevotella*. Более того, наличие *Prevotella copri*, доминирующего вида из рода *Prevotella*, провоцировало дефекты сперматогенеза. Приведенные данные свидетельствуют о потенциальном влиянии дисбиоза кишечной микрофлоры,

вызванного ВЖД, на нарушение сперматогенеза и подвижность сперматозоидов [314].

1.7.2 Сексуальные привычки

Исследование, основанное на использовании культуральных методов, показало, что у мужчин, которые никогда не вступали в половую связь, общая концентрация бактерий в семенной жидкости и их разнообразие были ниже, чем у сексуально активных мужчин [152]. Исследование мужчин, имеющих однополые сексуальные отношения, выполненное Liu С.М. et al. (2014), показало, что бактерии в семенной жидкости обследованных совпадают с теми, что ранее были описаны в составе вагинальной микрофлоры, в том числе *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Prevotella* и *Mycoplasma*. Описанные данные свидетельствуют о том, что сексуальная активность партнеров влияет на состав микробиома семенной жидкости. Следует отметить, что в современной литературе практически не представлены данные о связи определённых сексуальных привычек с изменениями в микробиоме [334].

1.7.3 Инфекции, передающиеся половым путем

В ряде работ показано, что инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) ассоциировано со снижением качества эякулята [113, 143, 282]. Механизмы, лежащие в основе этой связи, остаются неясными; сюда предположительно включают апоптоз, повреждения ДНК сперматозоидов и выработку антиспермальных антител. В образцах семенной жидкости, инфицированных ВПЧ, было обнаружено более высокое содержание *Moraxellaceae*, *Streptococcus* и *PeptoStreptococcus* [143].

Установлено, что изменения в микробиоме семенной жидкости наблюдаются при инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В ходе исследования Liu С.М. et al. (2014) было продемонстрировано, что у мужчин с

ВИЧ-инфекцией снижались разнообразие и насыщенность микробиома семенной жидкости, которые восстанавливались после шести месяцев антиретровирусной терапии. Уровень бактериальной нагрузки в образцах семенной жидкости был связан с содержанием провоспалительных цитокинов и вирусной нагрузкой, что указывает на роль микробиома в передаче ВИЧ половым путем [334].

Некоторые авторы считают, что необходимо выполнять диагностику и лечение только возбудителей из числа классических патогенов, возбудителей ИППП [101, 177]. На наш взгляд, данная позиция ограничена отсутствием серьёзной доказательной базы по иным микроорганизмам и, как следствие, отсутствием соответствующих клинических рекомендаций. Другие специалисты, напротив, склонны проводить лечебные мероприятия в отношении любых обнаруженных в половых путях инфекций, что является гораздо еще более неадекватным подходом.

Ситуация осложняется ещё и тем, что при использовании стандартных методов возможно выявлять менее 2% известных штаммов бактерий. Даже при возможности точной качественной и количественной оценки биоразнообразия населения репродуктивной системы, остается неясной возможность практического использования этой информации. Все это свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований в этом направлении.

1.7.4 Влияние микробиома на результаты применения вспомогательных репродуктивных технологий

Исследования, основанные на культуральных методах, не выявили различий в микробном составе эякулята у мужчин из пар, в которых наступила естественная беременность, по сравнению с теми, в которых этого не произошло [308]. В работе, выполненной Eggert-Kruse W. et al. (2007), анаэробные и потенциально патогенные бактерии были выделены у соответственно 94,7% и 84,2% фертильных мужчин. Кроме того, обследование по прошествии шести месяцев не обнаружило никакой связи между микробной колонизацией и

естественной беременностью [255].

Перед применением ВРТ обычно проводится исследование посевов семенной жидкости и секрета влагалища. При этом интерпретация положительных результатов бактериологических исследований у пациенток без симптомов может быть затруднительной в связи с возможностью контаминации. Тем не менее, было показано, что специфические патогены, такие, как *E. faecalis*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *G. vaginalis* и *E. coli*, более распространены в половых путях среди пар, у которых ЭКО не увенчалось успехом [150].

Слабая отрицательная корреляционная связь между бактериоспермией и оплодотворением у пар, которым проводились процедуры ЭКО, была зафиксирована Zeyad A. et al. (2018) ($r=-0,239$, $p < 0,05$) [248]. Было показано, что применение таких методов подготовки эякулята, как «поднятие со дна» («swim-up») и центрифугирование по плотности, обычно используемых в процессе применения ВРТ, может снизить количество бактерий при бессимптомном носительстве у бесплодных мужчин, однако полное очищение достигается редко [168]. Таким образом, представляется очевидным, что ВРТ, как правило, осуществляются в нестерильных условиях, несмотря на принятие мер для предотвращения контаминации образцов и оборудования.

Результаты исследований с применением технологии NGS подтвердили представленные выше данные, что свидетельствует о связи между определёнными типами микробиома семенной жидкости и результатами ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ). Štšepetova J. et al. (2020) изучили состав микробиома нативной, обработанной и инкубированной семенной жидкости, и питательных сред для ЭКО в 50 парах, проходящих процедуры ВРТ. Авторы выполнили секвенирование гипервариабельных участков V2 и V3 гена 16S рРНК и ПЦР в реальном времени. Было выявлено прогрессивное снижение количества бактериальных считываний в зависимости от образцов эякулята, более выраженное в нативном, чем в обработанном материале, а также более выраженное в обработанном, нежели в инкубированном материале [304].

Наиболее распространенными видами бактерий, выделенными из нативной семенной жидкости, были *Lactobacillus*, *Incertae sedis XI*, *Staphylococcus* и *Prevotella*. В обработанных образцах микробный состав был более разнородным. Повышенное содержание *Alphaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria* в обработанном эякуляте, так же, как и содержание *Corynebacterium* sp. в нативных образцах, было ассоциировано со снижением качества эмбрионов. Напротив, для пар с эмбрионами высокого качества была характерна более высокая концентрация микроорганизмов группы *Enterobacteriaceae* в нативной семенной жидкости. Бактерии были обнаружены в 8% образцов питательных сред для ЭКО с помощью методов NGS и более чем в 70% образцов – методом ПЦР в реальном времени. При этом наиболее распространенными родами были *Lactobacillus* и *Phyllocterium* [304].

Некоторые исследователи полагают, что микроорганизмы, содержащиеся в питательных средах для ЭКО, по-видимому, не влияют на частоту наступления беременности. В то же время Okwelogu S.I. et al. (2021) на основании результатов секвенирования участка V4 16S рНК продемонстрировали, что образцы семенной жидкости, полученные от пар с клинически наступившей беременностью после ИКСИ, были в большей степени колонизированы *Lactobacillus jensenii* и *Faecalibacterium*, чем образцы от пар с неблагоприятными исходами ВРТ. При этом у первых пар также была отмечена более низкая концентрация *Proteobacteria*, *Prevotella* и *Bacteroidetes* [201]. Другое исследование, в котором был использован метод секвенирования переменных участков 3 и 4 16S рНК, не выявило различий в составе микробиома семенной жидкости и его разнообразии у мужчин из пар, в которых наступила беременность после ИКСИ, так же как и у тех, для которых ВРТ не были успешными [84].

Анализ микробиома эндометрия женщин, перенёсших ЭКО, показал, что 73,9% образцов, исследованных с помощью методов NGS, были заселены одним или несколькими микроорганизмами. Это наблюдение ещё раз подчёркивает тот факт, что процессы репродукции человека, по-видимому, происходят в присутствии бактериальной микробиоты [98].

1.8 Методы коррекции дисбактериоза яичек

1.8.1 Хирургические методы коррекции варикоцеле в лечении бесплодия

В качестве одной из наиболее распространенных причин первичного и вторичного мужского бесплодия рассматривается варикоцеле, хирургическое лечение которого может способствовать улучшению качественных показателей спермограммы и увеличению вероятности наступления беременности [20]. В то же время единое мнение относительно влияния варикоцеле на функцию клеток Лейдига и продукцию тестостерона, а также о роли этого заболевания в развитии орхалгии до настоящего времени не выработано. Вопросы целесообразности оперативного лечения варикоцеле у пациентов с гипогонадизмом и орхалгией, а также селекции пациентов для проведения варикоцелэктомии все еще остаются нерешенными. Отдельной проблемой является дилемма лечения варикоцеле у бесплодных мужчин с азооспермией [159].

Нарушение целостности генетического материала сперматозоидов может быть важным фактором, препятствующим наступлению беременности как естественным путем, так и с помощью процедур ВРТ [20, 264]. К настоящему времени установлено, что повреждения генетического материала сперматозоидов в большинстве случаев являются следствием влияния образа жизни, нарушениями соотношения гистоны/протамины, приема лекарственных препаратов, инфекции, а также варикоцеле. Оксидативный стресс при этом является ведущим механизмом фрагментации ДНК сперматозоидов [107]. Принято считать, что повышение уровня оксидативного стресса у пациентов с варикоцеле связано с нарушением гемодинамики яичка и повышением внутритестикулярной температуры [1]. В ряде исследований было отмечено увеличение уровней маркеров оксидативного стресса, которое коррелировало со степенью варикоцеле, при этом хирургическое лечение варикоцеле приводило к снижению концентрации маркеров оксидативного стресса [302]. В некоторых исследованиях была также показана взаимосвязь между варикоцеле и фрагментацией ДНК

сперматозоидов. При этом отмечено снижение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов после хирургического лечения варикоцеле [235].

Baker K. et al. (2013) отмечали наступление беременности в 51% случаев после проведенной хирургической коррекции варикоцеле [237]. Субингинальное микрохирургическое лигирование вен семенного канатика приводило к наступлению беременности в 55% пар, по данным Leung L. et al. (2013) [290].

На сегодняшний день общепринятым является проведение оперативного лечения у бесплодных пациентов с клинически значимой степенью варикоцеле и патоспермией. Однако в ряде случаев мужской фактор бесплодия может иметь место и у пациентов с нормальными показателями спермограммы, что может быть связано с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, высокой степенью анеуплоидии сперматозоидов, аномальной упаковкой хроматина – нарушениями, которые могут наблюдаться в том числе у пациентов с нормозооспермией. Было показано, что хирургическая коррекция варикоцеле приводит к увеличению частоты беременности, достигнутой естественным путем, а также в результате лечения с применением методик ВРТ, что в определенной степени является следствием снижения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов [237, 266].

Варикоцелэктомия способствовала снижению уровня анеуплоидии сперматозоидов. В рандомизированном исследовании Mansour Ghanaie M. et al. (2012), включавшем 136 пар с проблемой неразвивающейся беременности, в которых у пациентов имелось варикоцеле, было выявлено значительное увеличение концентрации, подвижности и нормальной морфологии сперматозоидов, а также повышение частоты беременности и снижение частоты спонтанных абортов в группе пациентов, которым проводилось оперативное лечение [95].

Оперативное лечение варикоцеле II и III степени, выполненное по поводу орхалгии, приводило к увеличению концентрации и прогрессивной подвижности сперматозоидов у пациентов с нормозооспермией [234]. Также было выявлено увеличение степени зрелости сперматозоидов и степени протаминизации

хроматина после выполнения варикоцелэктомии у пациентов, имевших нормозооспермию по данным обследования перед оперативным лечением [349]. Таким образом, в отдельных случаях варикоцелэктомия может рассматриваться в качестве метода лечения бесплодия у пациентов с нормозооспермией.

Li F. et al. (2012) провели метаанализ, включавший 9 исследований, в котором оценивалось влияние оперативного лечения варикоцеле на показатели тестостерона. Авторами было отмечено увеличение уровня тестостерона в среднем на 97,48 нг/дл по сравнению с состоянием до оперативного лечения [92].

Abdel-Meguid T.A. et al. (2014) также выявили увеличение концентрации тестостерона в среднем на 44,7 нг/мл после оперативного лечения варикоцеле в проспективном исследовании. Более выраженный положительный эффект наблюдался у пациентов, имевших изначально более низкие показатели тестостерона [94].

Показана также роль хирургического лечения варикоцеле у пациентов с необструктивной азооспермией – одной из наиболее тяжелых форм мужского бесплодия варикоцеле, которая встречается у 5% пациентов с НОА. Положительное влияние варикоцелэктомии на концентрацию, подвижность и морфологические характеристики сперматозоидов у пациентов с олигозооспермией было продемонстрировано во многих хорошо организованных исследованиях, однако вопрос о целесообразности лечения варикоцеле у пациентов с НОА остается предметом дискуссии [27].

Роль варикоцеле в патогенезе азооспермии остается предметом научных исследований, тем не менее предполагается, что хирургическое лечение варикоцеле может способствовать снижению стрессового воздействия, оказываемого на тестикулярную ткань, и увеличению продукции сперматозоидов. Matthews G.J. et al. (1998) были представлены результаты лечения 78 бесплодных мужчин (22 с азооспермией и 56 с олигоастенозооспермией), которым проводилась микрохирургическая варикоцелэктомия. У 55% мужчин с азооспермией после оперативного лечения в эякуляте определялись подвижные сперматозоиды [194]. В проспективном неконтролируемом исследовании Abdel-

Meguid T.A. et al. (2011) определяли подвижные сперматозоиды в эякуляте у 10 из 31 пациента, которым проводилась субингвинальная микрохирургическая варикоцелэктомия. Подобные результаты были получены Kiraç M. et al. (2013), которые определяли подвижные сперматозоиды в эякуляте после микрохирургической коррекции варикоцеле у 7 из 23 пациентов с НОА [171].

По данным мета-анализов, проведенных в рамках 3 ретроспективных исследований, был выявлен значительный положительный эффект варикоцелэктомии в отношении частоты обнаружения сперматозоидов при выполнении тестикулярной экстракции у пациентов с НОА. Ustuner M. et al. (2015) выявили гистопатологические изменения в тестикулярной ткани у пациентов с НОА после перенесенной варикоцелэктомии. Картина, характерная для Сертоли-клеточного синдрома, определялась в гистологических образцах от 14 из 19 пациентов, набранных для исследования. Улучшение гистологической картины наблюдалось у 5 пациентов с картиной Сертоли-клеточного синдрома. У 3 пациентов имелись участки фокального сперматогенеза и у 2 пациентов определялся блок развития на поздних стадиях после проведенной варикоцелэктомии. Таким образом, последние данные поддерживают гипотезу о положительном влиянии хирургического лечения варикоцеле на сперматогенез у пациентов с НОА [348].

В настоящее время появляется все больше сведений, подтверждающих способность варикоцелэктомии улучшать показатели целостности генетического материала сперматозоидов, а также повышать вероятность успеха лечения бесплодия с применением ВРТ. В метаанализе 7 исследований, выполненном Kirby E.W. et al. (2016), включавшем 1241 пациента, оценивалось влияние хирургического лечения варикоцеле на частоту беременности и живорождения в парах, проходящих лечение с использованием ВРТ, в которых у мужчин имелась азоо- или олигозооспермия. Было показано, что варикоцелэктомия улучшала частоту беременности и живорождения у пациентов с олигозооспермией, а также частоту обнаружения сперматозоидов у пациентов с азооспермией. У пациентов после варикоцелэктомии наблюдается не только разрешение азооспермии с

появлением сперматозоидов в эякуляте, но и (при сохраняющейся после операции азооспермии) повышение вероятности успешной тестикулярной экстракции сперматозоидов, что также сопровождается увеличением частоты живорождения при проведении внутриматочной инсеминации [344].

Таким образом, для оценки влияния хирургического лечения варикоцеле на репродуктивные исходы применения ВРТ у пациентов с НОА необходимы правильно организованные, рандомизированные контролируемые исследования. Однако, согласно имеющимся в настоящее время данным, лечение варикоцеле следует рассматривать перед проведением тестикулярной экстракции для интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (TESE/ICSI) у всех мужчин с азооспермией, у которых есть клинически значимое варикоцеле.

1.8.2 Диета

Выявление взаимосвязей между составом микробиоты и состоянием мужской репродуктивной функции способствовало попыткам разработки и апробации методов лечения мужской инфертильности с учётом полученных данных. Согласно концепции персонализированной медицины, существует большое количество доказательств того, что характеристики диеты могут влиять на состав микробиоты и качество спермы; в частности, эти факторы зависят от калорийности компонентов пищи, а также содержания в ней жирных кислот, углеводов и белков. В данном контексте высокое потребление насыщенных жирных кислот может привести к снижению мужской фертильности, в то время как здоровый режим питания, например, средиземноморская диета, способствует сохранению микробиоты и качества спермы [118, 161, 291]. И, напротив, как уже было отмечено, диета, характерная для ряда экономически развитых стран, а также РФ, приводит к быстрому распространению ожирения, связанного с гиперинсулинемией и гипергликемией, которые, в свою очередь, ассоциированы с нарушениями функции сперматозоидов [128].

Исходя из вышеприведенных данных, были предложены меры по

улучшению питания с целью поддержания мужской репродуктивной функции. Например, было показано, что средиземноморская диета положительно влияет на репродуктивную функцию мужчин, особенно в случае употреблении оливкового масла первого отжима. Согласно проведённым исследованиям, потребление данного продукта способно привести к изменению липидного состава мембран сперматозоидов, снижая окислительный стресс и усиливая функцию митохондрий [214]. Кроме того, средиземноморская диета оказывает нормализующее гомеостатическое действие на эндокринную и иммунную системы, также изменяя состав микрофлоры кишечника и обладая в этом отношении противовоспалительным действием [62]. Вполне вероятно, что подобная диета может благоприятно влиять на микробиоту яичек, хотя указанное предположение нуждается в дальнейшем подтверждении.

1.8.3 Пробиотики и их влияние на мужскую репродуктивную функцию

Согласно определению, пробиотики – это «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина» [228]. Такие препараты используются для улучшения репродуктивной функции у мужчин благодаря их способности усиливать барьерную функцию кишечника, подавлять рост патогенных микроорганизмов и активировать иммунный ответ [315]. Показано, что у лиц с астенозооспермией 3-недельный приём *Lactobacillus* (L.) *rhamnosus* и *Bifidobacterium longum* приводил к улучшению подвижности сперматозоидов при одновременном снижении степени фрагментации ДНК [239].

В другом исследовании применение симбиотика Familact®, состоящего из штаммов *Lactobacillus* и фруктоолигосахаридов, у пациентов с идиопатическим мужским бесплодием отмечалось улучшение качества спермы и увеличение целостности ДНК; при этом было зарегистрировано уменьшение содержания свободных радикалов в сперме [122].

У мужчин с астенозооспермией наблюдалось общее улучшение показателей

спермограммы на фоне приема лакто- и бифидобактерий, при этом подвижность сперматозоидов возросла, а степень фрагментации ДНК заметно снизилась [239].

В экспериментах у мышей с ожирением на фоне диеты с высоким содержанием жиров добавление *L. rhamnosus* к рациону приводило к повышению подвижности сперматозоидов и увеличению числа клеток Лейдига. У бесплодных мышей введение культур *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae* (пивных дрожжей) и фотосинтезирующих бактерий снижало выраженность нарушений состава спермы и сопровождалось улучшением подвижности сперматозоидов [176].

В исследованиях *in vivo* и *in vitro*, а также на моделях некоторых заболеваний, показано, что определённые штаммы бактерий-пробионтов благоприятно воздействуют на кинематические параметры сперматозоидов [93, 176]. Так, добавление *Lactobacillus rhamnosus* PB01 в корм мышей с алиментарным ожирением привело к значительному повышению числа прогрессивно-подвижных сперматозоидов, интенсифицировало выработку репродуктивных гормонов у животных, а также существенно увеличило темпы снижения массы тела у взрослых особей [176].

Повышение качества спермы и сперматогенеза наблюдалось также после трансплантации фекальной микробиоты, полученной от мышей, корма которых содержат в большом количестве альгинатный олигосахарид. За счёт него в их кишечнике активно размножаются бактерии-пробионты [157].

Эксперименты на стареющих мышах продемонстрировали, что добавление пробиотиков в рацион питания способствует восстановлению профиля поперечного сечения семенных канальцев и прежних уровней тестостерона, а также стимулирует сперматогенез в этой группе грызунов. Таким образом, можно заключить, что пробиотики оказывают благоприятное влияние на качество спермы путем нормализации тестикулярной функции [86].

Кроме того, результаты ряда исследований позволили предположить, что микробиом кишечника способен изменять степень проницаемости ГТБ [311]. Однако консенсус по вопросу того, какую роль пробиотики могут играть в работе

ГТБ, не достигнут и этот аспект нуждается в дальнейшем и более детальном изучении.

Ещё одним положительным аспектом привнесения препаратов бактерий-пробиотов в организм служит увеличение количества и средней массы тела особей в приплоде кроликов, самцы которых питались кормом, содержащим повышенные концентрации нитратов. Это явление свидетельствует о своеобразном «антистерилизующем» эффекте пробиотиков и их положительном влиянии на производство потомства [306].

На сегодняшний день предложено несколько гипотез, объясняющих природу улучшения функции сперматозоидов на фоне приема пробиотиков. Zhang J. et al. (2020) исследовали действие доминирующего рода «полезных» бактерий (*Lactobacillus casei*) в присутствии патогенных (*Pseudomonas aeruginosa*) на модели *in vitro*. Авторы обнаружили, что в подобных условиях бактерии *L. casei* значительно увеличивают подвижность сперматозоидов и снижают степень выраженности их митохондриального повреждения, вызванного *P. aeruginosa*. Изолированное же применение препаратов *L. casei* не изменяет эти параметры. Таким образом, установлено, что лактобактерии улучшают качество спермы, подавляя активность доминирующей группы патогенных бактерий и ограничивая их негативное влияние [123].

Исследования, выполненные *in vivo*, показали, что пробиотики способны воздействовать на тестикулярную функцию и сперматогенез путём модификации состава микробиоты кишечника, а также за счёт своих антиоксидантных свойств. Взаимосвязь между ключевыми представителями микробиоты кишечника и яичек исследовали с помощью корреляционного анализа Спирмена [175]. Было установлено, что наличие представителей типов *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и семейства *Deferribacteres* оказались в значительной степени связано со снижением тестикулярной функции, обусловленным присутствием выделяемого ими диэтилгексилфталата (ДЭГФ). Контролировать численность этих бактерий и восстанавливать нормальную функцию яичек после повреждения, обусловленного их инвазией, позволяет профилактический приём препаратов

Lactobacillus plantarum TW1-1, что было продемонстрировано в эксперименте на мышах, подвергшихся действию ДЭГФ [175]. Таким образом, можно предположить, что отдельные штаммы бактерий-пробионтов способны облегчать симптомы тестикулярного повреждения именно путем изменения состава кишечной микробиоты.

Хорошо известно и о неблагоприятном воздействии окислительного стресса на молекулы ДНК, представленные в сперматозоидах. Нарушение целостности ДНК резко ограничивает способности последних к оплодотворению и является главной причиной их клеточной дисфункции. Показано, что назначение препаратов *L. rhamnosus* СЕСТ8361 и *Bacteroidetes longum* СЕСТ7347 улучшает подвижность сперматозоидов, снижает степень фрагментации ДНК и внутриклеточные уровни H_2O_2 в них [66]. Очевидно, пробиотики способны улучшать качество спермы, выступая в роли антиоксидантов [239].

1.8.4 Пребиотики, антиоксиданты и полифенолы

Олигофруктоза, галактоолигосахариды и олигосахариды грудного молока являются наиболее типичными пребиотиками, способными повышать уровни бифидо- и лактобактерий, а также короткоцепочечных жирных кислот [259]. В ходе доклинического исследования были представлены доказательства того, что применение маннанолигосахаридов способно приводить к ускорению полового созревания у крыс [321]. В частности, снижение уровня кортикостерона в крови, наблюдавшееся в этом исследовании, может быть связано с повышенным уровнем тестостерона и созреванием семенных канальцев. Однако клинических исследований по оценке возможности лечения мужского бесплодия пребиотиками не проводилось.

Витамины С и Е способны оказывать особенно благоприятное воздействие при лечении бесплодия у мужчин, снижая уровень активных форм кислорода, приводя к улучшению подвижности сперматозоидов и поддерживая целостность ДНК [259]. Из других антиоксидантов необходимо отметить ликопин,

содержащийся в томатах и красных фруктах, который, по-видимому, оказывает положительное воздействие на митохондрии яичек, в частности, модулируя перекисное окисление липидов в мембране митохондрий [187]. Однако другие исследования, в которых изучалось применение антиоксидантов, не продемонстрировали какого-либо улучшения биомаркеров спермы и снижения степени фрагментации ДНК у мужчин с бесплодием [90].

Полифенолы – это природные соединения, которые в основном содержатся во фруктах, овощах, масле, вине и какао [245, 289]. Эти вещества оказывают мощное противовоспалительное и антиоксидантное действие на различные типы клеток, включая сперматозоиды [112, 331]. Были проведены экспериментальные и клинические исследования по изучению эффектов кверцетина и ресвератрола, однако их результаты оказались довольно противоречивыми, поскольку оба указанных полифенола обладают как антиоксидантной, так и прооксидантной активностью [210, 243, 245].

1.9 Перспективы дальнейших исследований микробиома мужской репродуктивной системы

Развитие сферы исследований микробиоты позволило изучить сложные микробные сообщества мужского репродуктивного тракта. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в характеристике микроорганизмов и их потенциальных функций, необходимо совершенствование используемых подходов, что позволит продвинуться в решении проблемы лечения мужского бесплодия [144, 323].

Стандартизированные протоколы. Для обеспечения надежности и воспроизводимости результатов исследований необходимо разработать стандартизированные протоколы сбора образцов и их обработки, а также выделения ДНК и NGS-анализа. Это облегчит сравнение данных и позволит объединять и сопоставлять результаты, полученные различными исследовательскими группами [80].

Выбор переменных участков для секвенирования в гене 16S рРНК может влиять на точность и достоверность результатов. Следует уделить внимание определению наиболее информативных переменных участков, специфичных для микробиоты изучаемых отделом мужской репродуктивной системы. Это поможет разработать стандартизированный подход к секвенированию, повысит сопоставимость результатов различных исследований и облегчит проведение мета-анализов.

Метагеномное секвенирование методом «дробовика». Несмотря на то, что большинство опубликованных исследований было сосредоточено на идентификации бактерий, микробиота, вероятно, включает также вирусы и грибы. В дальнейших работах для идентификации и характеристики этих микроорганизмов следует использовать метагеномный метод, который позволит получить полное представление о микробном разнообразии и его потенциальной роли в развитии мужского бесплодия [204].

Минимизация контаминации. Контаминация является серьезной проблемой, возникающей при изучении микробиоты. Следует уделять приоритетное внимание строгим мерам по предотвращению и выявлению контаминации на всех этапах исследования. Целесообразно внедрять отрицательный контроль во время сбора образцов, извлечения ДНК, подготовки библиотеки и секвенирования, что повысит надёжность результатов и сведет к минимуму влияние потенциальной контаминации на интерпретацию получаемых данных [323].

Определение патогенных штаммов. Известно, что некоторые виды бактерий могут иметь патогенные и непатогенные штаммы. Поэтому крайне важно отличать штаммы, которые потенциально могут причинить вред, от штаммов, которые являются комменсалами. Эти подтипы можно определить с помощью методов NGS и различных баз данных [308]. Подобный подход позволит эффективнее определить, какой микроорганизм является недружественным, а какой – вполне безвредным или даже полезным для организма человека.

Функциональная роль микробиома мужских половых путей и его влияние на сперматогенез изучены крайне недостаточно. Вполне вероятно, что микробиота участвует в регуляции иммунной микросреды яичек, передаче сигналов и обеспечении питательными веществами. Как полагает ряд авторов, внимание в процессе дальнейших исследований следует сосредоточить не только на описании компонентов микробиома, но и на анализе их функции в этой системе с использованием методов *in vitro* и *ex vivo* и изучении взаимодействия хозяина и микробиома – аналогично тому, как это было сделано для кишечного и респираторного микробиомов [323].

Исследование различных анатомических зон. Микробиом семенной жидкости, вероятно, ведёт свое происхождение из нескольких участков репродуктивного тракта. Параллельная оценка состава микробиома каждого из органов – яичек, придатков яичек, семявыносящих протоков, предстательной железы, семенных пузырьков, мочеиспускательного канала и полового члена – может дать более глубокое представление об их значимости для лечения мужского бесплодия и способствовать проведению более индивидуального лечения.

Лонгитюдные исследования. Лонгитюдные исследования имеют решающее значение для выявления динамических изменений в микробиоте семенной жидкости и понимания их потенциального влияния на мужскую фертильность. В последующем целесообразно уделять внимание планированию лонгитюдных исследований для изучения временных изменений в составе и функциях микробиоты человека при различном состоянии репродуктивного здоровья. Это позволит определить влияние микробиоты семенной жидкости на физиологические и патологические процессы, а также её значимость в этиопатогенезе бесплодия и изменений эякулята [164].

Перспективные исследования необходимы для установления связи между микробиотой репродуктивного тракта и репродуктивными исходами. Подобные работы должны включать мониторинг микробиоты репродуктивного тракта у мужчин из пар, стремящихся к наступлению беременности естественным путем

или посредством ВРТ. Проспективные исследования позволили бы проанализировать влияние микробиома семенной жидкости на фертильность и успешность ВРТ, сопоставив профили микробиоты с частотой наступления беременности, развитием эмбриона и другими исходами ВРТ.

Влияние факторов, приводящих к мужскому бесплодию. Мужское бесплодие может быть вызвано различными причинами, и в том числе – генетическими факторами, гормональным дисбалансом, инфекциями и структурными аномалиями. Следует уделить внимание изучению специфического влияния различных причин бесплодия на микробиом семенной жидкости. Результаты подобных исследований позволят выяснить, связаны ли различные микробные факторы с этиологией бесплодия, а также помогут разработать персонализированные стратегии целенаправленной терапии [65].

Влияние лекарственных препаратов. Процесс лечения мужского бесплодия может включать применение различных препаратов и методов терапии, таких, как витаминные добавки, антибиотики и гормональные средства. В последующем следует выяснить, влияют ли эти меры на микробиом репродуктивного тракта. Понимание воздействия используемых терапевтических подходов на микробные сообщества позволит оценить их потенциальный вклад в фертильность и послужит основанием для разработки персонализированных схем лечения пациентов с бесплодием.

Заключение

Мужское бесплодие – серьёзное заболевание, которым страдает значительная часть населения, особенно в развитых странах. Анализ данных научной литературы свидетельствует, что установленное в последние десятилетия снижение качества спермы, по-видимому, сопровождается дисбалансом уровней репродуктивных гормонов и высокими уровнями эндокринных дизрапторов, повреждениями ДНК, а также эпигенетическими и митохондриальными нарушениями [336]. Однако из-за разнообразия исследуемых популяций и

различий эпидемиологических моделей получаемые результаты, проводимых исследований, нередко оказываются противоречивыми. Тем не менее, накопленные к настоящему времени данные обуславливают растущий интерес со стороны специалистов в области здравоохранения, демографии и социальной политики различных государств.

В последние годы появляется все больше сообщений, подтверждающих гипотезу о влиянии микробиома репродуктивного тракта на мужскую фертильность. Специалисты сходятся в том, что изучение различных аспектов этих влияний представляет собой перспективную область исследований, которая позволит охарактеризовать сложные микробные сообщества, обитающие в мужском репродуктивном тракте, и оценить их роль в развитии бесплодия. К настоящему времени установлены сложные взаимосвязи между составом микроорганизмов, мужской фертильностью и качеством эякулята; обнаружено потенциальное влияние мужского микробиома и на репродуктивное здоровье женщин. Данные, собранные в ходе различных исследований с применением культуральных методов и NGS, позволили получить ценную информацию о составе, динамике развития и потенциальных функциях микробных сообществ. Совершенствование методологии исследований в этой области позволит обеспечить надёжность и воспроизводимость результатов, которые облегчают проведение точных сравнений данных и мета-анализов. Оптимальный выбор переменных участков для секвенирования в гене 16S рРНК и применение метагеномных подходов (метода «дробовика») для оценки наличия вирусов и грибов в микробиоте семенной жидкости являются чрезвычайно важными факторами, влияющими на успешность будущих исследований.

Проведение проспективных и лонгитюдных исследований, а также изучение влияния различных причин мужского бесплодия и лекарственных препаратов позволит изучить сложные взаимосвязи между микробиомом различных отделов репродуктивной системы и репродуктивными исходами. Изучение этих аспектов даст возможность глубже изучить проблему мужской фертильности и откроет путь для разработки и внедрения в клиническую практику персонализированных

методов ее лечения. В свою очередь изучение микробиома яичек и семенной жидкости представляет собой динамичную и быстро развивающуюся область изучения мужского репродуктивного здоровья, потенциально способную усовершенствовать и повысить эффективность методов лечения мужского бесплодия.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация и дизайн исследования

Проведен ретроспективный и проспективный анализ данных 108 пациентов, проходивших обследование по поводу мужского бесплодия на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий Центра репродуктивной и клеточной медицины ГБУЗ ДГКБ г. Краснодар Министерства здравоохранения Краснодарского края в 2018–2024 гг.

Материалом исследования послужили результаты обследования, в том числе образцы тестикулярной ткани инфертильных пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле.

Использовали следующие **критерии включения** пациентов в исследование:

- мужчины в возрасте 18 лет и старше;
- бесплодие в браке более 1 года при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции;
- подтвержденная обструктивная или необструктивная азооспермия;
- отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, их гипоплазии, онкологической патологии;
- отсутствие клинико-лабораторных симптомов инфекций, передаваемых половым путем, в течение 3 месяцев до исследования;
- отсутствие антибактериальной терапии в течение 3 месяцев до исследования;
- подписанное добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- повышение концентрации простатспецифического антигена в сыворотке крови более 4 нг/мл и/или его свободной фракции более 5 нг/мл;
- установленные генетические и эндокринные факторы бесплодия;
- регулярный прием лекарственных средств, приводящих к развитию

бесплодия и гипогонадизма;

- тяжелая соматическая патология на момент обследования;
- наличие онкологической патологии;
- признаки ИППП на момент обследования и в течение последних 3 месяцев перед включением в исследование;
- ВИЧ-инфекция;
- психические заболевания;
- хронический алкоголизм и наркомания.

С целью диагностики после предварительного обследования с оценкой общесоматического статуса, а также по основной патологии, каждому пациенту была выполнена microTESE в рамках протокола ВРТ, а также с целью диагностики бесплодия и возможности криоконсервации.

Полученный материал был отправлен на рутинное патогистологическое исследование. При проведении гистологического анализа важным этапом микроскопического изучения биоптата яичка являлась оценка степени нарушений сперматогенеза по шкале D. De Kretser и A. Holstein, что подтверждало диагностику азооспермии различного генеза. Помимо оценки состояния семенных канальцев изучали межканальцевую структуру паренхимы яичка, оценивали состояние микроциркуляторного русла и соотношение клеток Лейдига, фибробластов, макрофагов и мастоцитов. Для определения ИГХ-экспрессии маркеров мастоцитов использовали иммуногистохимическую окраску с анти-МСТ (Anti-Mast Cell Tryptase).

Для исследования структуры микробиоты тестикулярной ткани был проведен анализ ампликонов бактериального гена 16S рРНК с использованием высокопроизводительного NGS. Также для исследования бактериального пейзажа урогенитального тракта и контроля чистоты метода был произведен забор биологического материала из уретры у каждого пациента, которому проводилась биопсия яичка.

Дизайн работы представлен на Рисунках 2.1-2.4.

На первом этапе исследования было выполнено обоснование и апробация применения метода прогноза необходимости применения ВРТ с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин на основании иммуноморфологических характеристик ткани яичка при нарушениях сперматогенеза (Рисунок 2.1).

Этап 1 - Обоснование и апробация метода прогноза необходимости применения ВРТ с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин на основании иммуноморфологических характеристик ткани яичка

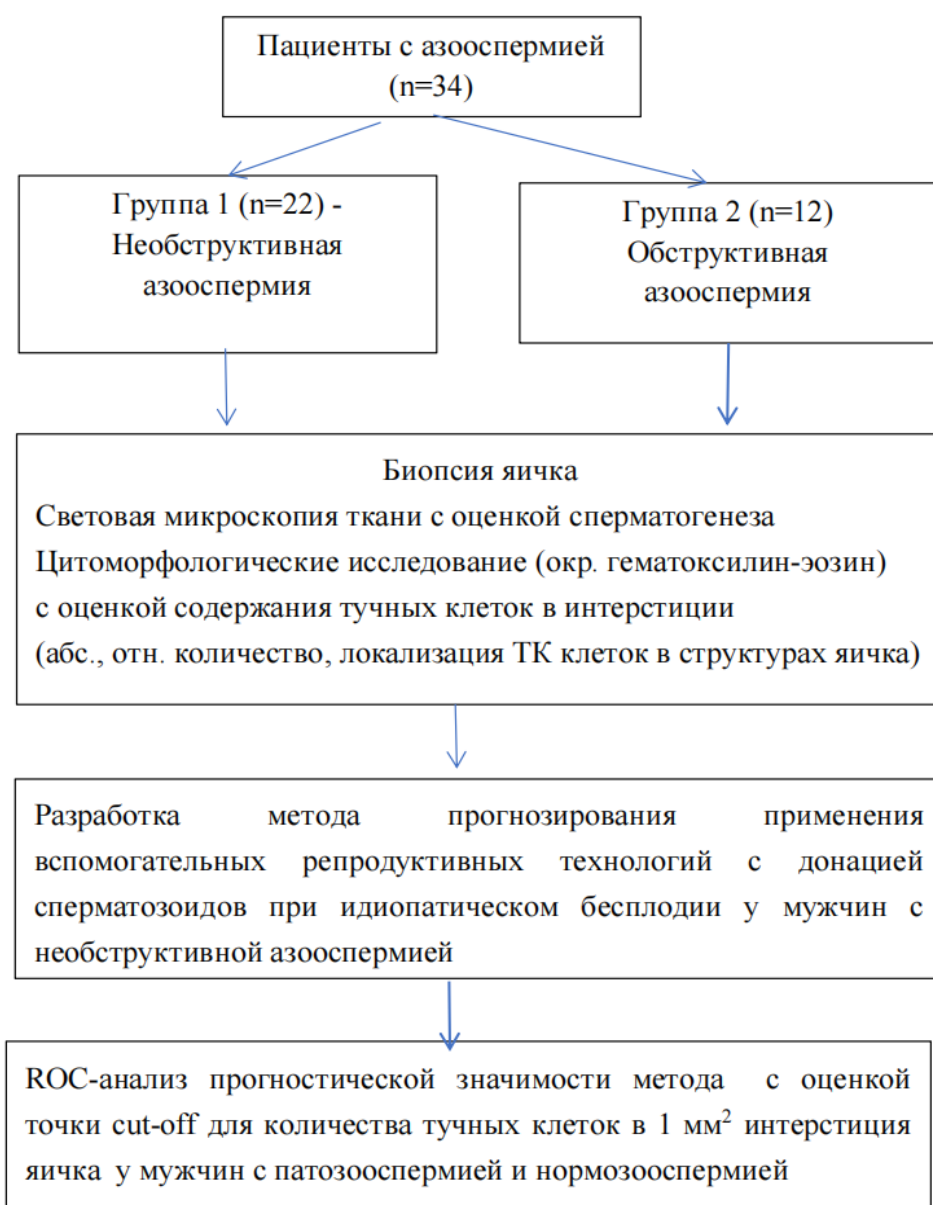


Рисунок 2.1 - Этап исследования 1

Этап включал экспериментальное исследование роли карбоксипептидазы 3 (CPA3)-позитивных тучных клеток яичка в нарушениях сперматогенеза, в ходе которого было проведено исследование распределения тучных клеток в семенных канальцах при различных видах азооспермии и дана цитоморфологическая характеристика CPA3-позитивных тучных клеток у пациентов с различными формами азооспермии.

В исследование были включены 34 мужчины с азооспермией. Возраст пациентов составил от 24 до 52 лет при необструктивной азооспермии и от 26 до 49 лет при обструктивной форме мужского бесплодия. Главным критерием выбора пациентов стало отсутствие сперматозоидов в эякуляте при отсутствии генетических нарушений, острых воспалительных заболеваний репродуктивного тракта, тяжелых метаболических нарушений, наличии системных заболеваний и варикоцеле.

Пациенты были разделены на две группы: 1 группа – пациенты с необструктивной азооспермией (n=22), 2 группа – пациенты с обструктивной азооспермией (n=12).

По показаниям всем пациентам выполнялась биопсия яичка, с последующим морфологическим изучением биоптатов. Сначала, после стандартной гистологической проводки, срезы биоптатов яичка окрашивались гематоксилином и эозином, что далее с помощью световой микроскопии позволяло визуализировать структуры извитых семенных канальцев и интерстиция яичка и провести количественный и качественный анализ сперматогенеза.

Эти данные позволили осуществить патогенетическое обоснование, разработку и апробацию алгоритма прогнозирования применения ВРТ с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин с необструктивной азооспермией.

На **втором этапе работы** выполнена разработка малоинвазивного метода выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин (патент) (Рисунок 2.2).

Этап 2 - Разработка малоинвазивного метода выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин



Рисунок 2.2 - Этап исследования 2

Применение этих методов позволило получить характеристики тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле.

Была выполнена сравнительная оценка таксономического состава микробиоты уретры и ткани яичка на основании данных о частоте встречаемости различных представителей микробиоты у 76 пациентов, в том числе у 34 - с обструктивной азооспермией, у 21 пациента с необструктивной азооспермией и у 21 пациента с НОА и сопутствующим варикоцеле.

Третий этап исследования был посвящен поиску взаимосвязей уровней гормонов и характеристик микробиоты уретры и ткани яичка у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле (Рисунок 2.3).

Этап 3 - Изучение уровней гормонов и характеристик сперматогенеза в сопоставлении с характеристиками микробиоты уретры и ткани яичка у пациентов с различными видами азооспермии

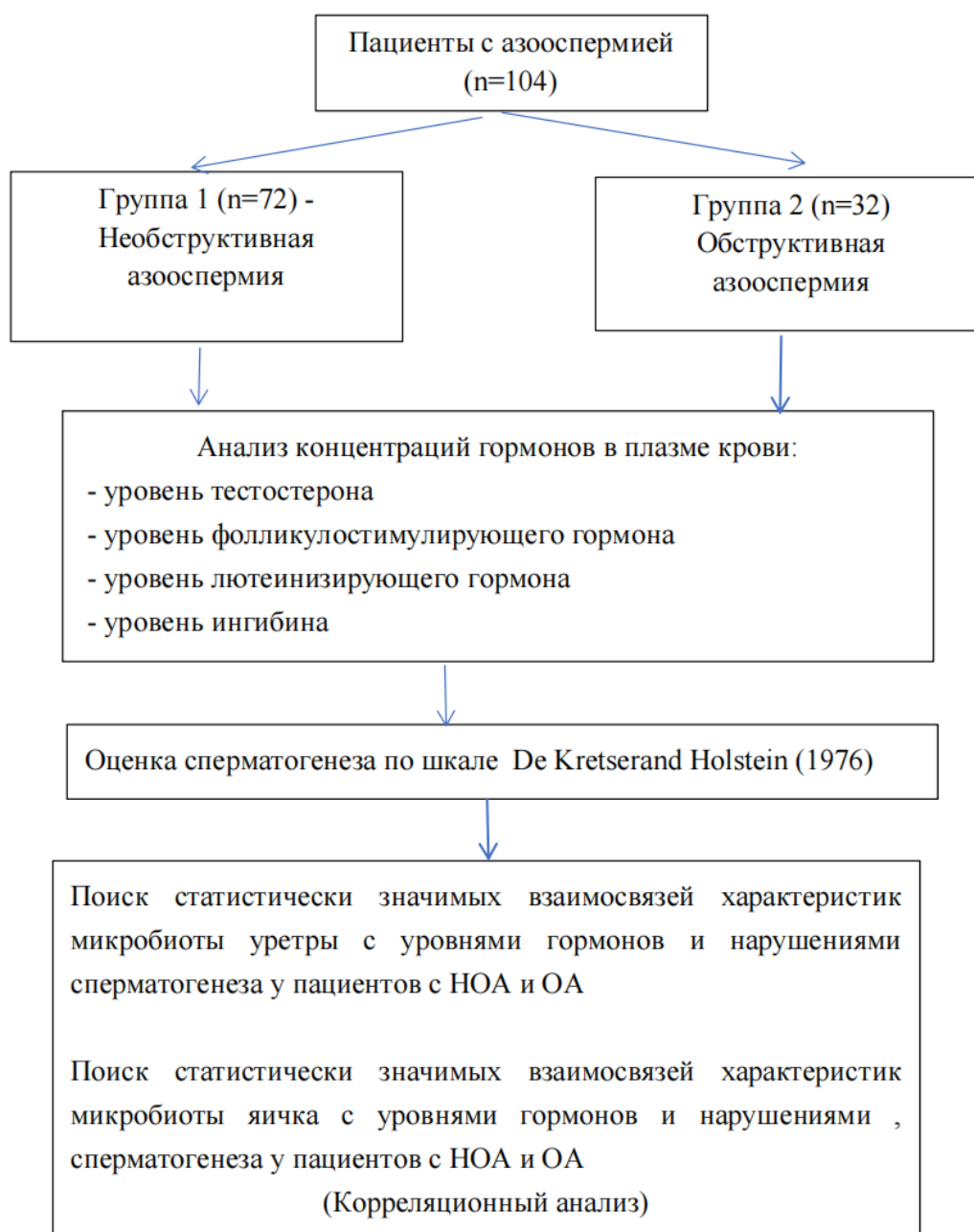


Рисунок 2.3 - Этап исследования 3

Показатели гормонального статуса и шкалы оценки сперматогенеза D. De Kretser и A. Holstein, были оценены у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле. Был произведен поиск статистически

значимых ассоциаций показателей состава микробиоты уретры и ткани яичка с клинико-лабораторными показателями у пациентов с НОА и ОА.

На четвертом этапе работы был произведен сравнительный анализ таксономической структур микробиоты тестикул и уретры пациентов с обструктивной азооспермией с положительными результатами применения ВРТ (рожденные дети) и пациентов с отрицательным результатом (Рисунок 2.4).

Этап 4 - Разработка модели прогнозирования результатов программ ВРТ с использованием характеристик микробиоты яичка и уретры у пациентов с азооспермией

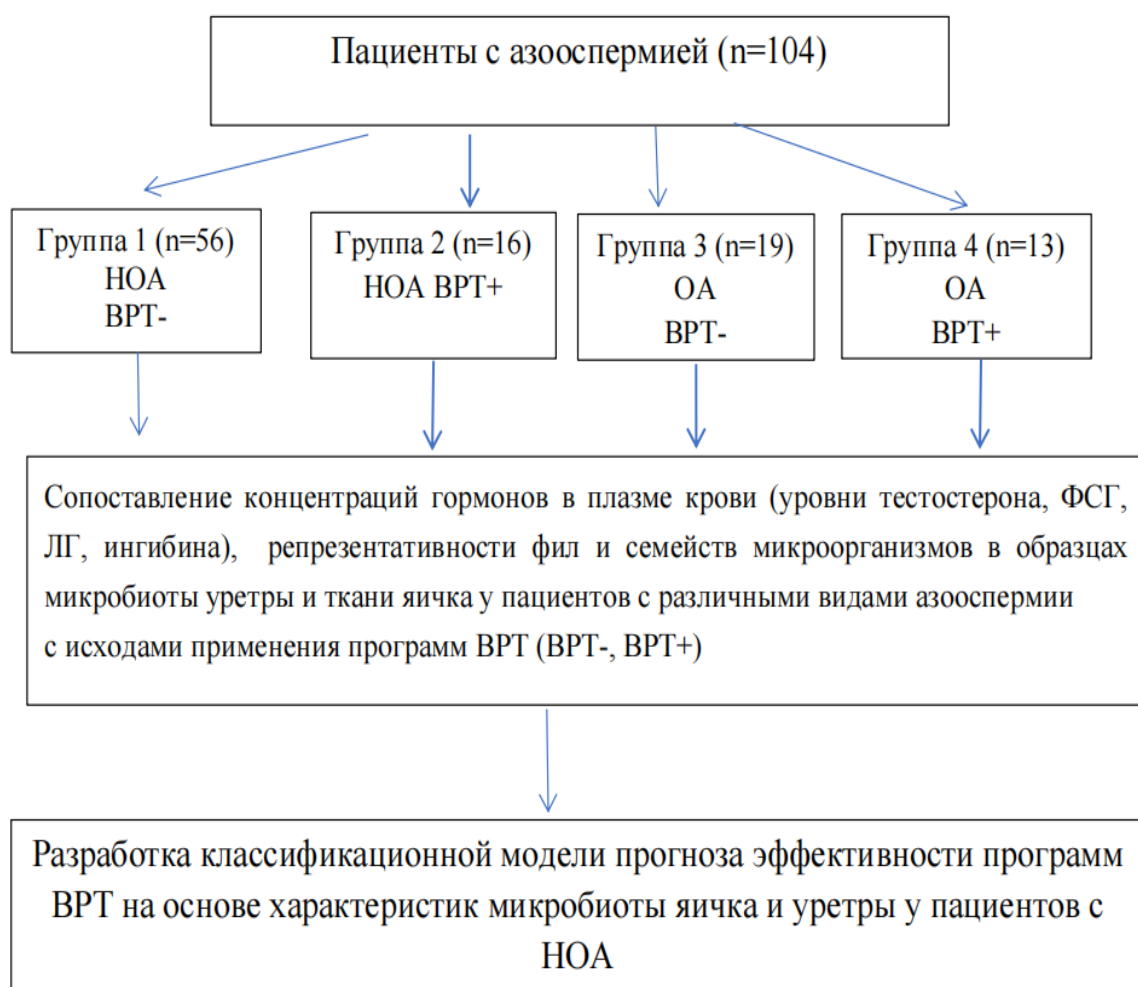


Рисунок 2.4 - Этап исследования 4

Задачами этого этапа исследования явился поиск варианта микрофлоры

урогенитального тракта у пациентов положительным результатом ВРТ, а также выявления особенностей представленности отдельных семейств микробиоты при неудачном исходе ВРТ.

При этом проводили оценку гормонального статуса пациентов, тестикулярной и уретральной микробиоты у пациентов с различными видами азооспермии в сопоставлении с результатами применения вспомогательных репродуктивных технологий. Был изучен уровень гормонов плазмы крови, выполнен анализ характеристик таксономического состава микробиоты ткани яичка и уретры на уровне семейств у пациентов с НОА и ОА в сопоставлении с итогами применения программ ВРТ. Данные, обработанные с помощью машинного обучения с использованием метода «дерево решений» позволили разработать модель прогноза эффективности ВРТ на основе обнаружения видов в микробиоте яичка и уретры у пациентов с НОА.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Клинические методы обследования пациентов

На этапе включения пациентов в исследование проводили сбор жалоб, анамнеза, физикальный осмотр и обследование по стандартам протоколов для пар, вступающих в протокол ВРТ.

2.2.2 Лабораторные методы исследования

Спермограмму проводили в соответствии с «Руководством ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью» (ВОЗ, 2010) после 3-5 дневного полового воздержания

Всем пациентам, включенным в исследование, проводили стандартные лабораторные исследования крови, которые включали определение группы крови

и резус-фактора, госпитальный комплекс (анализы на ВИЧ, гепатиты В, С, сифилис), клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, посев мочи. Общий и клинический анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Sysmex XN-1000.

Выполняли определение уровней гормонов в плазме крови: тестостерон (Т), норма - 8,4-28,1 нмоль/л; фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), норма - 1,4-18,1 мМЕ/мл; лютеинизирующий гормон (ЛГ), норма - 1,5-9,3 мМЕ/мл; ингибин В, норма - 147-364 пг/мл. Все гормоны исследовали иммуноферментным методом. Определение гормонального статуса позволило исключить эндокринный генез infertility у обследуемых пациентов.

Анализ для определения микроделений хромосомы Y проводили методом мультиплексной ПЦР (мПЦР) с одновременной амплификацией нескольких фрагментов ДНК. Анализ микроделений в локусе AZF проводили в два этапа. На первом этапе проводили идентификацию полных делеций, на втором – частичных делеций AZF локуса хромосомы Y.

Для анализа бактериального пейзажа урогенитального тракта у всех участников исследования проводился забор биологического материала из уретры, а также осуществлялась биопсия яичка. Биологический материал был получен из мазков уретры и путем микрохирургической экстракции сперматозоидов из паренхимы яичка в стерильных условиях в ходе стандартной процедуры извлечение сперматозоидов из яичек (micro-TESE).

Для реализации репродуктивного потенциала всем пациентам была выполнена micro-TESE в протоколе BPT. Методика проведения micro-TESE впервые описана Schlegel в 1999 г. в качестве наиболее эффективной для извлечения сперматозоидов у infertильных мужчин с НОА и последующим проведением ЭКО по технологии ИКСИ [265].

Степень нарушения сперматогенеза у каждого пациента оценивалась по десятибальной шкале, состояния сперматогенеза (Таблица 2.1).

Исследование бактериального разнообразия тестикулярной ткани и уретры было выполнено с использованием высокопроизводительного NGS.

Таблица 2.1 – Шкала оценки состояния сперматогенеза De Kretser and Holstein (1976)

Балл	Гистологические данные			
	Количество зрелых сперматид/ каналец	Высота зародышевого эпителия (мкм)	Спермиация	Диагноз
10	10 > 20	80	Частая	Интактный сперматогенез
9	9 > 20	< 80	Редкая	Ослабленный сперматогенез (гипосперматогенез)
8	8 < 20	< 80	Отсутствует	Ослабленный сперматогенез (гипосперматогенез)
7	Отсутствуют	Множество круглых незрелых сперматид	-	Нарушение дифференцировки сперматид
6	Сперматиды отсутствуют	Множество первичных сперматоцитов	-	Блокада созревания первичных сперматоцитов
5	Сперматиды отсутствуют	Отдельные первичные сперматоциты	-	Блокада созревания первичных сперматоцитов
4	Сперматиды отсутствуют	Первичные сперматоциты отсутствуют	Только сперматогонии	Блокада созревания сперматогониев
3	Зародышевые клетки отсутствуют	Только клетки Сертоли	-	Сертоли-клеточный синдром
2	Дегенерирующие клетки Сертоли	Только клетки Сертоли	-	Сертоли-клеточный синдром

Для иммуногистохимического окрашивания использовали срезы яичка толщиной 2 мкм. Депарафинизированные срезы подвергали тепловому извлечению антигена (95°C, 30 мин) в R-УНИВЕРСАЛЬНОМ буфере (Artum

Biologics Ltd., Великобритания). Первичные антитела инкубировали в течение 12 ч при +4°C. Сначала проводили инкубацию с первичным антителом (кроличьи поликлональные антитела, AbCam, United Kingdom) в разведении 1:2000 при температуре +4°C, что позволяет получить более сильный и специфичный сигнал. После тщательного промывания выполняли инкубацию срезов со вторичной системой детекции. Связанные антитела визуализировали вручную вторичными антителами (Dianova/Molecular Probes), конъюгированными с Alexa Fluor-488/Cy3 (5-10 мкг/мл в PBS). СРАЗ-позитивные тучные клетки визуализируются как клетки с интенсивно окрашенными коричневыми гранулами в цитоплазме.

Для совмещённой детекции СРАЗ-позитивных тучных клеток и эластических волокон применяли комбинированный протокол (иммуногистохимическое исследование + окраска по Вайгерту).

Содержание тучных клеток в интерстиции яичка при различных видах азооспермии было оценено после сканирования гистологических срезов на сканере Leica Aperio AT2. Планиметрический анализ для выявления количества ТК на единице площади ткани яичка, а также абсолютного числа ТК и других клеток интерстиция яичка выполнялся с помощью программного обеспечения цифрового анализа изображений QuPath [242].

2.2.3 Инструментальные методы исследования

Всем пациентам при госпитализации выполнялись исследования, относящиеся к категории обязательных скрининговых, для выявления заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной системы, в том числе выявления очагов туберкулезной инфекции. При необходимости проводили компьютерную томографию органов грудной клетки и брюшной полости. Исследования проводили на томографах Phillips Brilliance 64 (64 среза) и Siemens Somatom Definition Flash (256 срезов). УЗИ почек, мочевого пузыря, ПЖ и органов мошонки проводили на аппаратах ультразвуковой цифровой диагностический сканер SONOACE R7-RUS, SONOACE X6-RUS линейным датчиком LN 5-12МГц

внутриполостным микроконвексным датчиком EVN4-9МГц, трансабдоминальным конвексным датчиком С 2-8 МГц.

2.3 Статистическая обработка полученных данных

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica for Windows 10.0 (StatSoft® Inc., США). Использованы методы описательной статистики и ряд непараметрических критериев для проверки значимости различий. Количественные показатели представляли в виде $M (SD)$, где M – среднее значение, а SD – среднее квадратичное отклонение, а также в виде $Me (25\%Q - 75\%Q)$, где Me – медианное значение показателя, а $25\%Q$ и $75\%Q$ – нижний и верхний квартили соответственно. Оценку распределения значений проводили при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное число и относительную величину в процентах.

Анализ различий в независимых выборках, где распределение количественного признака отличалось от нормального, проводили с помощью U -критерия Манна-Уитни.

Различия качественных признаков анализировали при помощи критерия χ^2 или с использованием непараметрического точного критерия Фишера.

С помощью корреляционного анализа проводили поиск ассоциаций характеристик микробиоты ткани яичка и простаты с концентрациями гормонов и показателем нарушения сперматогенеза.

Для оценки характеристик модели прогноза метода оценки тучных клеток в 1 мм^2 интерстиция яичка у мужчин с патозооспермией и нормозооспермией проведен ROC-анализ в программе MedCalc statistical software с построением ROC-кривых и построением LOESS-графиков, которое выполнялось в программе PAST4.

Для оценки прогностической значимости микробиоты тканей яичка и уретры у пациентов с НОА в контексте результата применения ВРТ была

разработана классификационная модель с использованием алгоритма дерева решений. В качестве входных параметров использовались данные о наличии или отсутствии определённых бактериальных таксонов.

Достоверность различий подтверждалась в случае недостижения p порогового уровня статистической значимости нулевой гипотезы 0,05.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ПРОГНОЗА НЕОБХОДИМОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ С ДОНАЦИЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ У МУЖЧИН НА ОСНОВАНИИ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТКАНИ ЯИЧКА ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

3.1 Изучение патогенетической роли СРА3-позитивных тучных клеток яичка в нарушениях сперматогенеза

Успешность сперматогенеза напрямую зависит от структурно-функциональных характеристик тканевого микроокружения семенников. В этой связи детальный анализ клеточного состава интерстиция яичка открывает новые перспективы для патогенетического обоснования диагностических подходов к мужскому бесплодию. Особое внимание исследователей привлекают такие популяции, как клетки Лейдига, фибробласты, макрофаги, лимфоциты и, в особенности, ТК, которые до сих пор остаются наименее изученными элементами стромы. Между тем, существует мнение, что именно ТК могут выступать ключевыми регуляторами локального гомеостаза. Благодаря широкому спектру рецепторов они участвуют в реализации сигнальных путей, обеспечивающих реакцию тканей на внешние и внутренние стимулы. Кроме того, тучные клетки способны избирательно высвобождать медиаторы и цитокины, формируя иммунный и стромальный ландшафт специфической тканевой ниши.

Ключевая роль в создании провоспалительного и профиброзного фона в локальных нишах яичка отводится ферментативной активности ТК – их протеазам (триптазе, химазе и карбоксипептидазе А3). По данным ряда авторов, именно активность этих ферментов во многом определяет вклад тучных клеток в патогенез мужского бесплодия. Однако, несмотря на доказанное участие карбоксипептидазы А3 (СРА3) в регуляции микроокружения тканей, вопрос о роли СРА3-позитивных тучных клеток в развитии нарушений сперматогенеза

остаётся открытым и требует дальнейшего изучения.

3.2 Критерии и методы оценки нарушений сперматогенеза

В исследование включено 34 мужчины с азооспермией (22 — с необструктивной формой, 12 — с обструктивной), средний возраст — $35,7 \pm 10,8$ лет. Всем пациентам выполнена биопсия яичка в протоколе ВРТ с последующим морфологическим анализом биоптатов для оценки состояния сперматогенеза. Возраст в группе необструктивной азооспермии составил $38,2 \pm 8,5$ года, в группе обструктивной — $35,7 \pm 6,8$ года. Степень нарушения сперматогенеза у пациентов оценивалась по десятибальной шкале.

Также с помощью световой микроскопии на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином выполняли оценку качественных сдвигов сперматогенеза на основании результатов морфологического исследования в соответствии с критериями, представленным в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Качественные морфологические признаки нарушения сперматогенеза

Качественные морфологические характеристики нарушения сперматогенеза	Морфологические признаки
Гипосперматогенез	<p>Просвет извитого семенного канальца выглядит более широким относительно диаметра канальца.</p> <p>В сперматогенном эпителии присутствуют все типы развивающихся половых клеток: сперматогонии, сперматоциты (особенно видимые в мейозе – в стадии пахитены), единичные круглые сперматиды. Зрелые сперматозоиды в просвете извитого семенного канальца отсутствуют.</p> <p>Последовательность созревания половых клеток не нарушена. Клетки расположены правильными слоями от базальной мембраны к просвету. Поскольку количество герминативных клеток снижено, клетки Сертоли становятся более заметными. Их ядра (крупные, бледные, с ядрышком) визуальнo кажутся чаще встречающимися, хотя их абсолютное количество обычно не увеличено</p>

Продолжение таблицы 3.1

Качественные морфологические характеристики нарушения сперматогенеза	Морфологические признаки
Остановка сперматогенеза	Значительное уменьшение толщины сперматогенного эпителия. Из-за прекращения развития половых клеток на определенной стадии отсутствуют клетки более зрелых стадий сперматогенеза после точки остановки (сперматоциты II порядка, удлинённые и круглые сперматиды, сперматозоиды), при этом клеток более ранних стадий сперматогенеза (сперматогонии, сперматоциты I порядка) сохраняются. Клетки Сертоли хорошо визуализируются, могут быть неизменёнными или содержать вакуоли в цитоплазме
Синдром наличия только клеток Сертоли	Полное опустошение сперматогенного эпителия извитых канальцев (отсутствие клеток сперматогенеза) с сохранением только клеток Сертоли. Просвет извитого семенного канальца пуст
«Смешанная атрофия»	Одновременное присутствие на гистологическом срезе канальцев с разной степенью повреждения сперматогенеза и фиброза. Наличие выраженного очагового разрастания коллагеновых волокон в оболочке повреждённых извитых семенных канальцев и в окружающем их интерстиции
Полная атрофия канальцев	Склероз извитых семенных канальцев. Герминативные клетки и сустентоциты отсутствуют. Отмечается значительное утолщение базальной мембраны за счет отложений коллагена IV, ламинина и других белков. Диаметр канальцев значительно уменьшен (иногда до размеров тяжей). Видны массивные отложения коллагеновых волокон вокруг атрофированных канальцев. Возможно необратимое замещение извитых семенных канальцев и интерстиция яичка фиброзной тканью

Для иммуногистохимического окрашивания использовали срезы яичка толщиной 2 мкм.

3.3 Характеристика нарушений сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии

У пациентов первой группы при морфологическом анализе нативных биоптатов яичка были получены сперматозоиды лишь у 4 (18,2%) мужчин (Рисунок 3.1). У абсолютного большинства – 18 пациентов с НОА (81,9%)

результаты биопсии яичка оказались неудовлетворительными: половые клетки обнаружены не были. В то же время у пациентов второй группы при морфологическом анализе нативных биоптатов яичка были получены сперматозоиды статистически значимо чаще – у 10 (83,3%) мужчин, тогда как в 2 случаях (16,7%) сперматозоиды отсутствовали. Таким образом, в группе НОА сперматозоиды обнаруживались статистически значимо чаще – в 4,6 раза ($p < 0,001$).

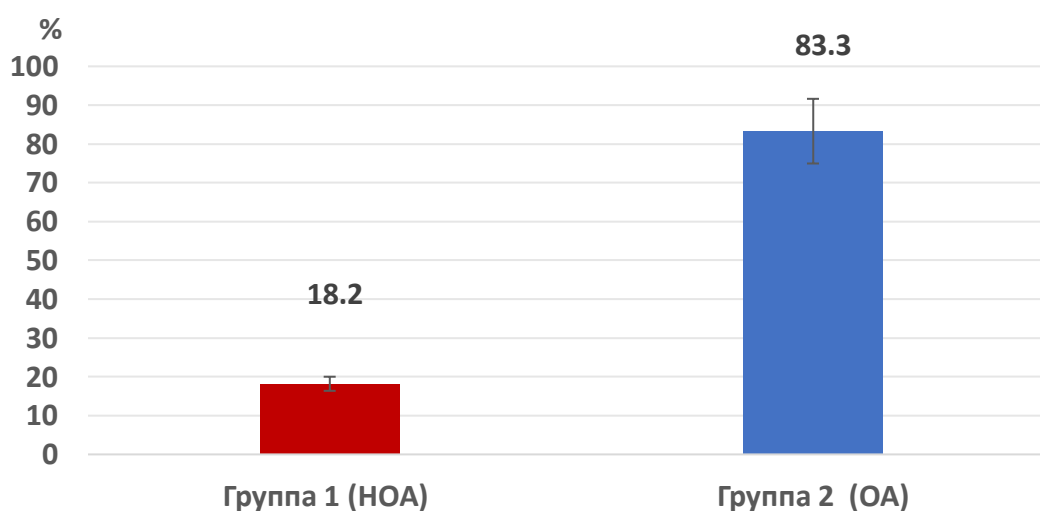


Рисунок 3.1 – Частота получения сперматозоидов при морфологическом анализе нативных биоптатов

Длительность бесплодия у пациентов с НОА составила $6,8 \pm 2,7$ лет, во второй группе (ОА) – $4,2 \pm 1,8$ лет, при этом статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было ($p < 0,05$). У всех обследуемых пациентов изменений кариотипа отмечено не было, уровень половых гормонов был в пределах референтных значений, количество лейкоцитов и уровни иммуноглобулинов А и G в эякуляте не превышали референтных значений.

Морфологический анализ биоптатов яичка показал, что характеристики сперматогенеза в группах пациентов статистически значимо различались и составили в группах 1 (НОА) и 2 (ОА): $2,77 \pm 0,71$ и $5,83 \pm 0,93$ баллов соответственно ($p = 0,001$) (Рисунок 3.2).

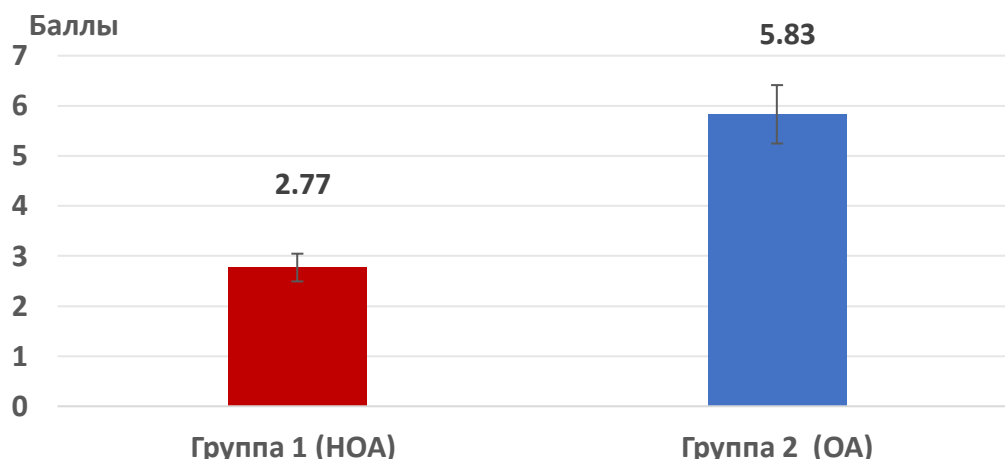


Рисунок 3.2 – Степень выраженности нарушений сперматогенеза у пациентов с различными вариантами азооспермии

3.4 Сравнительная оценка распределения тучных клеток в семенных канальцах при необструктивной и обструктивной азооспермии

Анализ распределения тучных клеток в семенных канальцах обследуемых пациентов показал, что количество ТК в 1 мм^2 ткани яичка составило $45,22 \pm 9,08$ у пациентов с НОА, в то время как в группе 2 (ОА) значение показателя было статистически значимо ниже – $26,05 \pm 10,31$ ($p = 0,012$) (Рисунок 3.3).

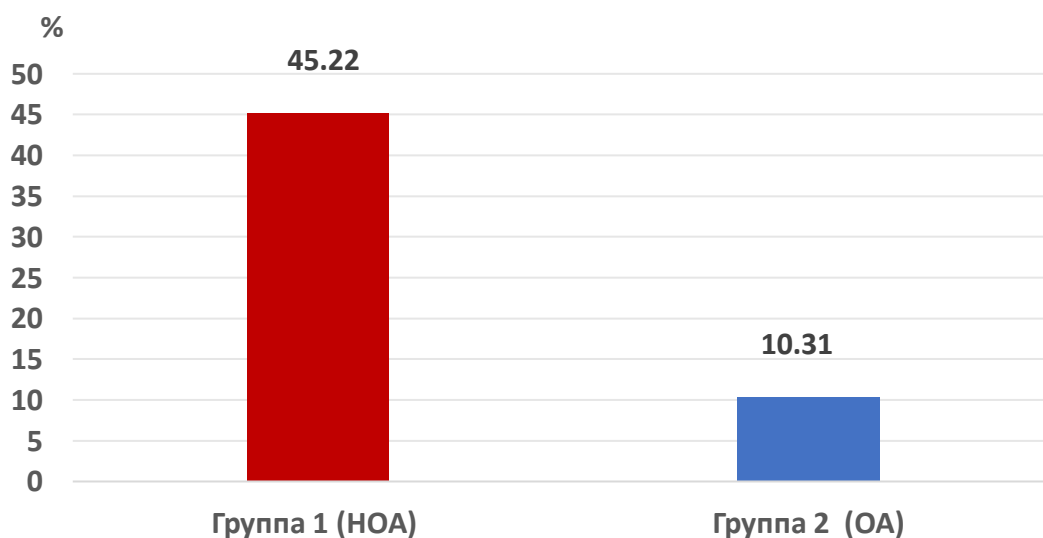


Рисунок 3.3 – Содержание тучных клеток в интерстиции яичка у пациентов с необструктивной и обструктивной азооспермией

Планиметрический анализ выявил неравномерное распределение СРАЗ⁺ТК в интерстиции яичка. Обращало на себя внимание, что большинство ТК локализовались в межтубулярном интерстиции яичка независимо от варианта мужского бесплодия, значительно меньшее количество ТК было локализовано вблизи микроциркуляторного русла или вокруг извитых семенных канальцев (Таблица 3.2). При изучении межтубулярного интерстиция было установлено, что у пациентов с НОА статистически значимо выше, чем в группе ОА было как абсолютное, так и относительное количество ТК в интерстиции на 1 мм².

Таблица 3.2 – Количественные показатели СРАЗ-активных тучных клеток в интерстиции яичка у мужчин с необструктивной и обструктивной азооспермией

Гистотопография ТК	Количество тучных клеток	Группы пациентов	
		Группа 1 НОА (n=72)	Группа 2 ОА (n=32)
Межтубулярный интерстиций яичка	Абсолютное количество на 1 мм ²	27,64 ± 9,31	19,09 ± 2,73*
	Относительное содержание в структуре клеток интерстиция (%)	0,51 ± 0,12	0,32 ± 0,06*
Перитубулярное микроокружение	Абсолютное количество на 1 мм ²	7,36 ± 1,27	1,94 ± 0,05*
	Относительное содержание в структуре клеток интерстиция (%)	0,13 ± 0,08	0,03 ± 0,02*
Периваскулярное микроокружение	Абсолютное количество на 1 мм ²	10,22 ± 2,69	2,62 ± 0,08*
	Относительное содержание в структуре клеток интерстиция (%)	0,18 ± 0,10	0,05 ± 0,03*

При анализе перитубулярного микроокружения выявленные соотношения сохранились и были еще более выраженными. При этом в обеих группах значения этих показателей были существенно ниже для перитубулярного микроокружения, чем для межтубулярного интерстиция.

Показатели количества ТК в периваскулярном были примерно на уровне таковым для перитубулярного окружении, выявленные межгрупповые различия сохранились: в группе 1 (НОА) величина абсолютного и относительного содержания ТК в структуре клеток интерстиция были статистически значимо выше, чем в группе 2 (ОА).

Примечание: различия статистически значимы ($p < 0,05$) по сравнению с

показателями при ОА по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, изучение особенностей локализации ТК в ландшафте тканевого микроокружения выявил их достоверные различия при различных формах патологии. В частности, у пациентов с НОА по сравнению с ОА большая доля СРАЗ⁺ ТК мигрировала в периваскулярное и перитубулярное тканевое микроокружение яичка.

Распределение СРАЗ⁺ тучных клеток в зависимости от выявленных качественных морфологических изменений и соответствующих нарушений сперматогенеза в извитых семенных канальцах пациентов групп 1 и 2 представлено в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Количество СРАЗ⁺ тучных клеток в зависимости от выявленных морфологических изменений в извитых семенных канальцах пациентов групп 1 и 2, Me (Q25; Q75)

Качественные показатели нарушения сперматогенеза	Группа 1 НОА (n=72)	Группа 2 ОА (n=32)
Гипосперматогенез	-	12,9 (11,42–14,4)
Остановка сперматогенеза	29,1 (26,0–34,5)	27,2 (23,7–32,0)
Синдром только клеток Сертоли	46,6 (35,8–57,1)	-
«Смешанная атрофия»	77,9 (77,3–78,5)	-
Полная атрофия канальцев	97,7	-

В таблице представлены качественные показатели нарушений сперматогенеза. Для группы с олигозооспермией описан случай гипосперматогенеза, в то время как в группе с нормозооспермией такое изменение не было зафиксировано. Остановка сперматогенеза отмечена в обеих группах, при этом уровень выраженности этой патологии оказался схожим. Синдром только клеток Сертоли наблюдается только у мужчин с нормозооспермией, в то время как в группе с олигозооспермией этот синдром не выявлен.

Также была зарегистрирована высокая степень смешанной атрофии только в

первой группе, а полная атрофия канальцев была зафиксирована только среди пациентов с нормозооспермией. Эти результаты акцентируют внимание на морфологических различиях и изменениях количественного содержания СРАЗ+ тучных клеток между двумя группами пациентов, что может иметь важное значение для диагностики и понимания причин бесплодия.

3.5 Цитоморфологическая характеристика СРАЗ-позитивных тучных клеток у пациентов с различными формами азооспермии

Изучение цитотопографических особенностей СРАЗ показало присутствие двух морфологических типов ТК, структурные характеристики которых зависели от топографии клеток в интерстиции яичка. ТК, включенные в структуру стенки извитых сменных канальцев, характеризовались удлиненной вытянутой формой, которая соответствовала расположению миоидных клеток семенных канальцев (Рисунки 3.4, 3.5). По-видимому, подобная форма клеток способствовала увеличению площади контакта ТК с миоидными клетками и усилению их влияния на гемато-тестикулярный барьер.

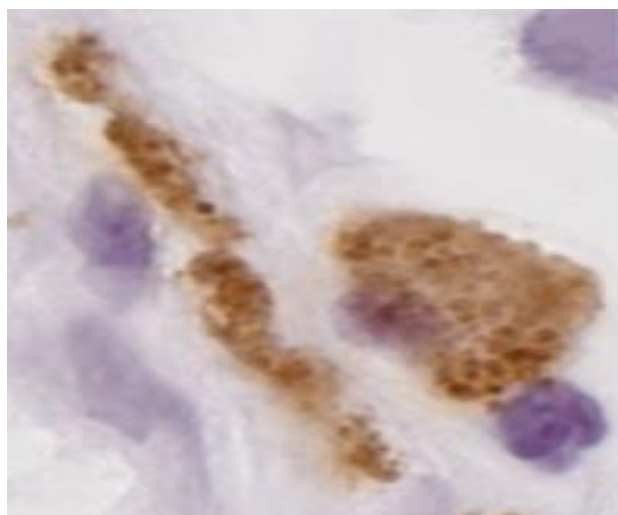


Рисунок 3.4 – Солокализация двух типов тучных клеток в интерстиции яичка: округлой и вытянутой формы. Моноплексное иммуногистохимическое исследование СРАЗ тучных клеток

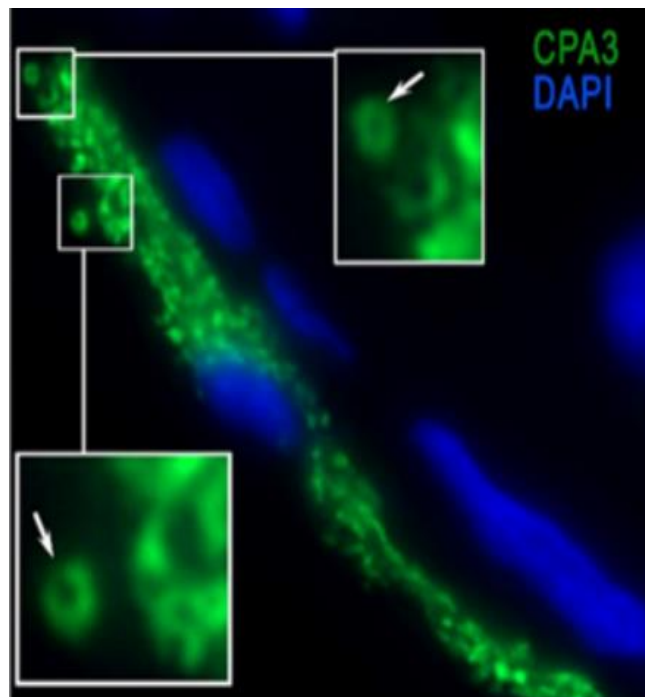


Рисунок 3.5 – Тучные клетки вытянутой формы в составе стенки семенного канала, наблюдается выведение секреторных гранул во внеклеточный матрикс - указано стрелкой (мультиплексная визуализация CPA3)

ТК, локализующиеся в межтубулярном интерстиции яичка, были более крупными размерами, их форма была округлой и могла изменяться в зависимости от функциональной нагрузки. Процессинг CPA3 в ТК яичка был аналогичен механизмам биогенеза специфической протеазы в тучных клетках других органов. CPA3 локализовалась преимущественно в секреторных гранулах и в меньшей мере аккумулировалась в межгранулярном пространстве.

Цито - и гистотопографические характеристики CPA3⁺ТК у пациентов с НОА отличались от таковых при ОА. В частности, помимо более высокого содержания ТК в интерстиции яичка, была отмечена более интенсивная секреция CPA3 во внеклеточный матрикс к соответствующим регулируемым мишеням. Обращала на себя внимание чаще наблюдавшаяся миграция ТК к эндотелию микроциркуляторного русла, а также выраженная секреция протеазы, действующей на клетки эндотелия (Рисунок 3.6).

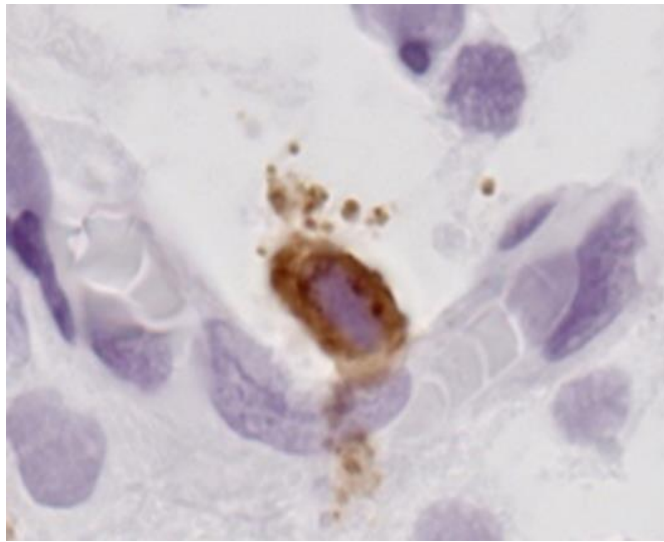


Рисунок 3.6 – Гистотопографическая характеристика СРАЗ-положительных ТК при необструктивной форме азооспермии, перикапиллярная ТК в состоянии активной секреции СРАЗ (моноплексная ИГХ СРАЗ тучных клеток)

Кроме того, при НОА ТК более часто, чем при ОА, выявлялись около стенки извитых семенных канальцев (Рисунок 3.7), в которых они активно дегранулировали, что способствовало поступлению СРАЗ во внеклеточный матрикс. Также ТК активно мигрировали в паракринное тканевое микроокружение клеток Сертоли и тесно контактировали с миоидными клетками (Рисунок 3.8).

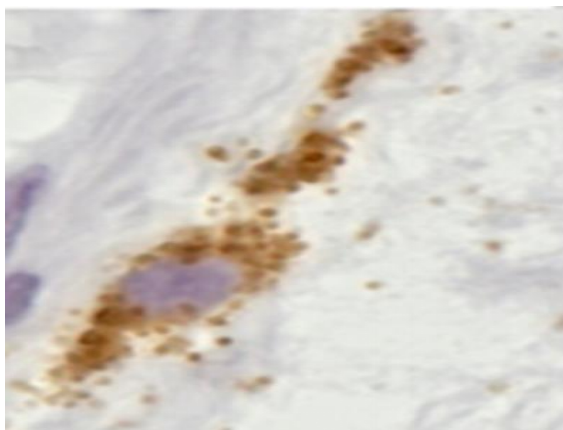


Рисунок 3.7 – Гистотопографические особенности СРАЗ-положительных ТК при необструктивной форме азооспермии, локализация ТК в стенке извитых семенных канальцев (моноплексная ИГХ СРАЗ тучных клеток)

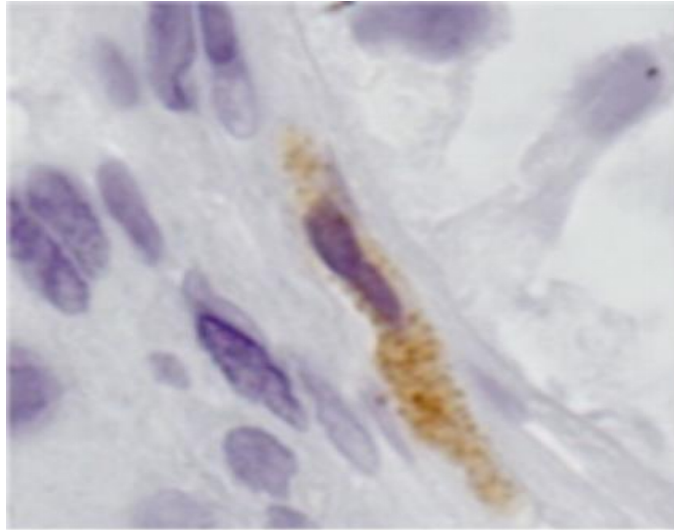


Рисунок 3.8 – Гистотопографические особенности СРА3-позитивных ТК при необструктивной форме азооспермии, близкая локализация СРА3-позитивных ТК к клетке Сертоли (моноплексная ИГХ СРА3 тучных клеток)

В отдельных случаях СРА3⁺ТК фактически являлись посредниками между клетками Лейдига и стенкой семенного канальца (Рисунок 3.9).

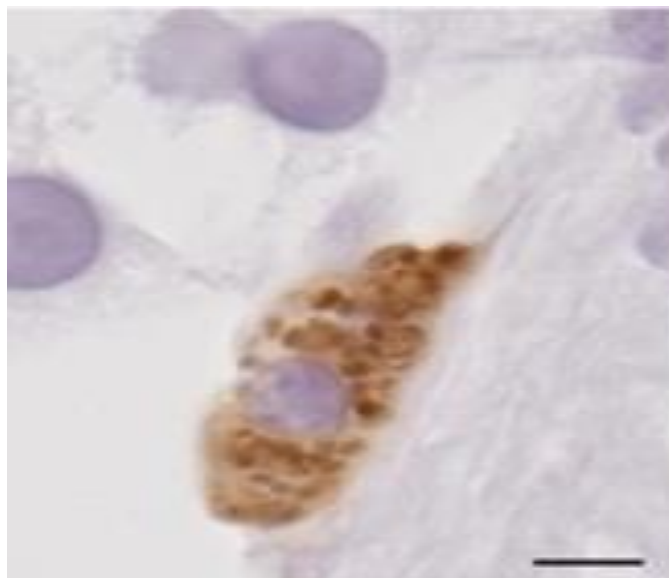


Рисунок 3.9 – Гистотопографические особенности СРА3-позитивных ТК при необструктивной форме азооспермии, близкая локализация СРА3-позитивных ТК к клеткам Лейдига (моноплексная ИГХ СРА3 тучных клеток)

Обращало на себя внимание также частое обнаружение ТК около клеток фибробластического дифферона интерстиция, в том числе миофибробластов. В интерстиции яичка часто выявлялись обширные поля, заполненные автономными секреторными гранулами, в которых часто сохранялось периферическое расположение СРАЗ. Эти характеристики сочетались с обнаружением сети эластических волокон в интерстиции яичка при необструктивной форме азооспермии, а также более высокой частоты солокализации СРАЗ⁺ТК с волокнистым компонентом внеклеточного матрикса (Рисунок 3.10).

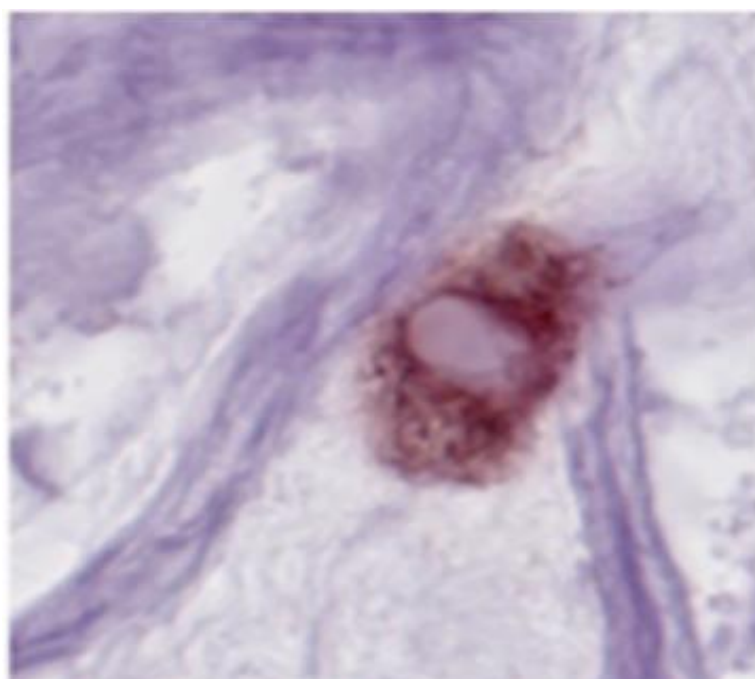


Рисунок 3.10 – Гистотопографические особенности СРАЗ-позитивных ТК при НОА, активное участие ТК в ремоделировании эластических волокон (иммуногистохимическая детекция СРАЗ с одновременным окрашиванием эластических волокон по методике Вейгерта)

При обструктивной форме азооспермии, так же, как и при необструктивной форме, ТК располагались в межтубулярном интерстиции яичка (Рисунок 3.11). В то же время количество ТК было статистически значимо меньше по сравнению с соответствующим показателем при необструктивной форме азооспермии.

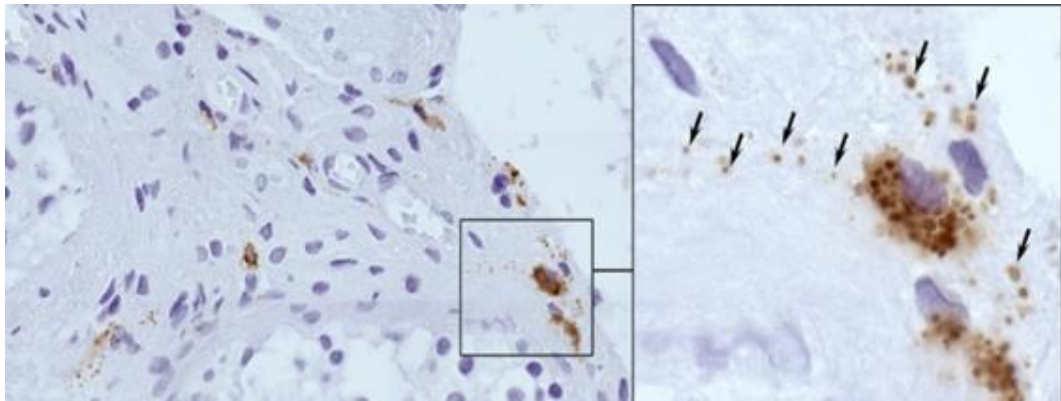


Рисунок 3.11 – Морфологическая характеристика CPA3-позитивных ТК при ОА, преимущественная локализация тучных клеток в интерстиции яичка между извитыми семенными канальцами, в увеличенном фрагменте стрелки указывают на секреторные гранулы, диффузно расположенные в интерстиции яичка (моноплексная ИГХ CPA3 тучных клеток)

Стоит отметить, что секреция автономных гранул во внеклеточный матрикс наблюдалась реже по сравнению с необструктивными формами мужского бесплодия. Кроме того, снижалось количество ТК вокруг элементов микроциркуляторного русла и стенки извитых семенных канальцев, частота прилегания к клеткам Лейдига, при сохранении уровня секреторной активности ТК (Рисунок 3.12).

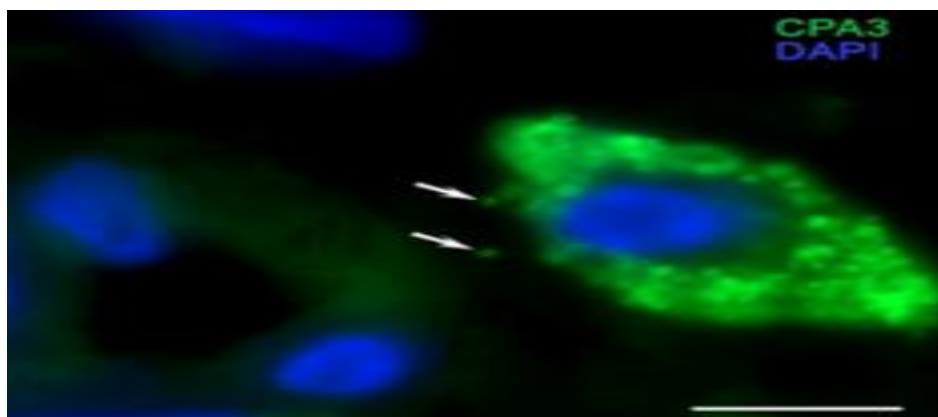


Рисунок 3.12 – Морфологическая характеристика CPA3-позитивных ТК при обструктивной форме азооспермии, периваскулярная локализация ТК, с секрецией CPA3-позитивных гранул к базальной мембране эндотелия, указаны стрелкой (мультиплексная визуализация CPA3)

Несмотря на наблюдаемую миграцию ТК непосредственно в стенку семенных канальцев, необходимо отметить более редкую частоту этого явления при ОА (Рисунок 3.13).

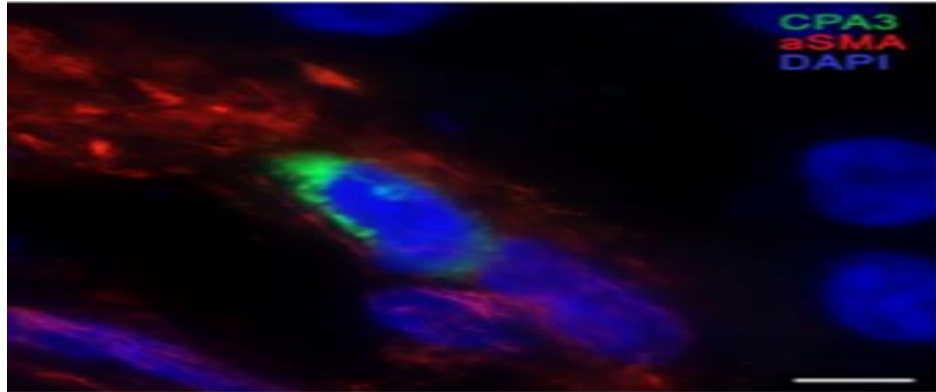


Рисунок 3.13 – Морфологическая характеристика CPA3-положительных ТК при обструктивной форме азооспермии, вариант морфологической интеграции ТК в оболочку извитого семенного канальца, и расположение между миоидными клетками (мультиплексная визуализация CPA3 и αSMA)

Несмотря на более высокое относительное содержание CPA3⁺ТК в межканальцевом интерстиции яичка у пациентов группы ОА, необходимо отметить более редкую сококализацию ТК с фибробластами, эластическими волокнами (Рисунок 3.14).

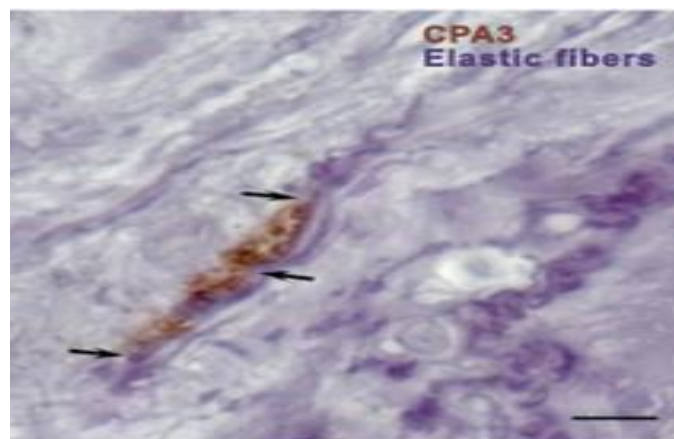


Рисунок 3.14 – Гистотопографические особенности CPA3-положительных ТК при обструктивной форме азооспермии, участие ТК в ремоделировании эластических волокон (иммуногистохимическая детекция CPA3 с одновременным окрашиванием эластических волокон по методике Вейгерта)

Корреляционный анализ свидетельствовал о наличии сильной статистически значимой взаимосвязи выраженности нарушений сперматогенеза по данным морфологического исследования (снижения показателя вышеприведенной шкалы) от количества СРАЗ⁺ТК в 1 мм² интерстиция яичка, то есть отрицательной зависимости. При этом коэффициент корреляции Спирмена в группе пациентов с НОА составил $r = -0,763$ ($p < 0,001$).

Аналогичная корреляция была выявлена и для пациентов с ОА, значение коэффициента корреляции составило $-0,759$ ($p = 0,004$). Таким образом, увеличение количества СРАЗ⁺ТК в интерстиции яичка негативно отражается на сперматогенезе.

3.6 Разработка метода прогнозирования применения вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин с необструктивной азооспермией

3.6.1 Современные подходы к оценке нарушений сперматогенеза при мужском бесплодии

Рутинным методом оценки фертильности эякулята выступает спермограмма, включающая определение концентрации, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов. Однако стандартные параметры спермограммы обладают ограниченной диагностической и прогностической значимостью, поскольку не позволяют в полной мере судить о функциональном потенциале гамет. Морфологическое исследование биоптатов яичка с применением традиционных окрасок, хотя и даёт информацию о текущем состоянии сперматогенного эпителия, не обеспечивает возможность долгосрочного прогнозирования его сохранности.

К числу принципиальных ограничений классической морфологической оценки эякулята относятся: субъективизм заключения, базирующегося на визуальном анализе ограниченного набора морфофункциональных признаков;

невозможность установления этиопатогенетических механизмов мужского бесплодия; а также высокая частота (до 40% и более) неинформативных результатов при идиопатических формах, когда показатели спермограммы соответствуют нормативным критериям фертильных мужчин. Указанное противоречие обусловлено отсутствием в рутинном анализе интегративных маркеров, отражающих глубинные молекулярно-клеточные механизмы дисрегуляции сперматогенеза.

В попытке преодолеть эти ограничения предложены методы, направленные на детекцию молекулярных повреждений генетического материала сперматозоидов: TUNEL-тест, регистрирующий фрагментацию ДНК по концевым мечениям; Comet assay (щелочной и нейтральный электрофорез единичных клеток в агарозе), визуализирующий одно- и двунитевые разрывы; SCSA, оценивающий структурную целостность хроматина и степень его денатурации, что коррелирует с фертильностью как в естественном цикле, так и в программах ВРТ. Количественный анализ клеток с повреждённой ДНК осуществляется методами проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

Несмотря на диагностическую ценность перечисленных подходов, их клиническое внедрение сдерживается высокой стоимостью и недостаточной стандартизацией протоколов, что обуславливает вариабельность получаемых результатов. Кроме того, дискуссионным остаётся сам биологический механизм, лежащий в основе детектируемых повреждений: фрагментация ДНК может быть следствием разнородных патогенетических процессов – первичных нарушений сперматогенеза, апоптотической гибели герминативных клеток или оксидативного стресса. При этом важно подчеркнуть, что фрагментация ДНК представляет собой поздний маркер апоптоза и не позволяет идентифицировать триггерные механизмы дисфункции сперматогенного эпителия.

В связи с вышеизложенным, на настоящем этапе исследования выполнена попытка установки корреляционных взаимосвязей между количественным содержанием ТК в интерстициальной ткани яичка и выраженностью нарушений сперматогенеза у пациентов с идиопатической формой мужского бесплодия.

Обнаружение статистически значимых ассоциаций между указанными параметрами может служить патогенетическим обоснованием для принятия клинического решения о целесообразности применения ВРТ с использованием донорских сперматозоидов.

3.6.2 Количественная оценка тучных клеток в интерстиции яичка

Нами предложен метод прогнозирования нарушений сперматогенеза неустановленного генеза, который основан на данных гистологического анализа биоптатов яичка.

У мужчин с идиопатической азооспермией получают биоптат яичка, методом световой микроскопии оценивают состояние сперматогенеза в извитых семенных канальцах в баллах. Также в условиях световой микроскопии оценивается интерстиций яичка и наличие в нем триптазаактивных ТК. Отдельно производился морфометрический подсчет ТК в 1 мм^2 и определение соотношения их количества с нарушением сперматогенеза.

Высокое содержание ТК в 1 мм^2 интерстиция яичка свидетельствует о выраженном хроническом воспалении гонады, о малой перспективе восстановления сперматогенного эпителия, низкой эффективности получения собственных сперматозоидов и прогнозирования необходимости выполнения протокола ВРТ с донацией сперматозоидов.

С целью разработки референсных значений для количества тучных клеток в интерстиции яичка нами был проведен ROC-анализ клинической базы пациентов ($n=32$), обратившихся в клинику по лечению бесплодия, в ходе которого была определена точка разделения (cut-off) для количества тучных клеток в 1 мм^2 интерстиция яичка у мужчин с патозооспермией и нормозооспермией.

При статистической обработке полученных данных (ROC-анализ) была определена площадь под ROC-кривой, которая соответствует взаимосвязи прогноза патозооспермии и количества триптазаактивных тучных клеток в 1 мм^2 интерстиция яичка у мужчин и составила $0,994 \pm 0,01$ с 95% ДИ: 0,979-1,0.

Пороговое значение количества триптазаактивных тучных клеток в точке cut-off составило 39,0 на 1 мм². При выявлении количества тучных клеток в интерстиции яичка в равном или превышающем данное значение прогнозировалась тяжелая степень бесплодия (патозооспермии) с низкой эффективностью ЭКО/ИКСИ с применением собственных сперматозоидов и высокий прогноз приверженности ИКСИ с использованием донорской спермы. Чувствительность и специфичность метода составила 95% и 100% соответственно.

3.6.3 Алгоритм клинического применения метода

Биопсия яичка была выполнена согласно общепринятым медицинским стандартам ВРТ посредством хирургического извлечения сперматозоидов методом микрохирургической экстракции сперматозоидов (Micro-TESE) [270]. После завершения процедуры неиспользованные биоптаты были подвергнуты фиксации в буферизированном растворе 4%-го формалина и последующей заливке в парафиновые блоки для последующего гистологического исследования.

Иммуногистохимическую детекцию триптазы ТК проводили с помощью антител Anti-Mast Cell Tryptase antibody (клон AA1, #ab2378, разведение 1:2000; Abcam, Великобритания). В качестве вторичных использовались козьи антитела #AS-M1-HRP, хромогенная детекция которых проводилась реагентом ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105) согласно инструкции производителя.

После стандартной процедуры обезвоживания срезы заключали в постоянную монтажную среду (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #H1000). Микроскопию проводили с помощью микроскопа «Olympus CX43» при общем увеличении оптической системы x 400.

Оценивали количество тучных клеток в 1 мм² интерстиция яичка.

Качество сперматогенеза оценивали на поперечных срезах извитых семенных канальцах в баллах с использованием шкалы оценки состояния

сперматогенеза De Kretser and Holstein (Таблица 2.1).

В случае выявления у пациента интенсивной инфильтрации интерстиция яичка триптазаактивными тучными клетками более 39 в 1 мм² на фоне нарушения сперматогенеза, оцененного на уровне 6 баллов и ниже, прогнозировали необходимость выполнения протокола ВРТ с донацией сперматозоидов.

По нашему мнению, применение вышеописанного подхода позволяет повысить эффективность программ ВРТ, тем самым принять своевременные меры к реализации повторного протокола ВРТ с использованием аутоспермиев или донацией половых клеток, уменьшить длительность программы и снизить субъективность морфологической оценки сперматогенеза.

3.6.4 Клинические примеры применения метода

Клинический пример 1.

Пациент А., 37 лет.

Диагноз: мужское бесплодие в течение 5 лет.

По данным спермограммы и клинического обследования - идиопатическая необструктивная азооспермия.

Оценки сперматогенеза – 2-3 балла.

Количество триптазаактивных тучных клеток составило 114 мм² в интерстиции яичка. Морфологически зрелые сперматозоиды при биопсии яичка не были получены. Прогноз восстановления сперматогенеза – отрицательный.

Клинический пример 2.

Пациент К., 27 лет.

Диагноз: мужское бесплодие, 3 года.

По результатам клинического обследования и данным спермограммы – идиопатическая необструктивная азооспермия. Оценка сперматогенеза составила 6 баллов. Количество триптазаактивных ТК – 39 мм² в интерстиции яичка. Морфологически зрелые сперматозоиды при биопсии яичка получены не были. Прогноз восстановления сперматогенеза – отрицательный.

Пациенту рекомендовано применение ВРТ с интрацитоплазматической инъекцией сперматозоида с использованием донорской спермы.

Клинический пример 3.

Пациент М., 30 лет.

Диагноз: Мужское бесплодие в течение 3 лет.

По данным клинического обследования и спермограммы – идиопатическая необструктивная азооспермия.

Сперматогенез оценен на уровне 7-8 баллов.

Количество триптазаактивных ТК составило 35 на мм² в интерстиции яичка. При биопсии яичка были получены единичные морфологически зрелые сперматозоиды, поэтому у мужчины была обобрана ткань яичка для криоконсервации и последующего выполнения ИКСИ после плановой подготовки партнерши к трансферу эмбриона.

Во всех приведенных клинических случаях мужского бесплодия данные лабораторного и инструментального исследования не выявили явных отклонений. Однако прослеживается четкая тенденция ухудшения сперматогенеза на фоне увеличения показателя количества тучных клеток в 1 мм² ткани яичка, что подтверждает сделанное нами предположение о том, что меньшее количество ТК в интерстиции яичка ассоциировано с лучшим прогнозом сохранности сперматогенеза в извитом семенном канальце яичка и успеха программы ВРТ.

В целом результаты исследования показали, что, высвобождая провоспалительные медиаторы, хемотаксические факторы и иммунорегуляторные цитокины, которые способствуют прогрессии фибриллогенеза, ТК, расположенные в интерстиции ткани яичка, могут вызывать снижение тестикулярной функции и нарушения сперматогенеза. Данный факт нашел подтверждение в клинических наблюдениях пациентов с необструктивной азооспермией и без явных объективных причин мужского фактора бесплодия, у которых в интерстициальном пространстве яичка были обнаружены ТК.

Установлено, что ТК являются триггером в формировании патоспермии за счет высокой способности к миграции в соединительной ткани, которая

усиливается во время воспаления, и выработки множества медиаторов, начиная от предварительно сформированных протеаз и гистамина, заканчивая синтезированными *de novo* цитокинами, хемокинами и липидными медиаторами. Таким образом, повышенное количество тучных клеток может служить маркером в тактике преодоления мужского фактора бесплодия.

Разработанный метод диагностики позволяет получать информацию о тяжести нарушений сперматогенеза, обусловленных изменениями клеточного микроокружения в интерстиции яичка, а также обеспечивает повышение точности диагностики идиопатического бесплодия мужчин и оценку перспективы сохранности развития мужских половых клеток. В случае, когда перспективы консервативного и хирургического лечения мужского бесплодия у пациента отсутствуют, следует рекомендовать супружеской паре выполнение протокола ВРТ с донацией сперматозоидов.

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТИКУЛЯРНОЙ И УРЕТРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ АЗОСПЕРМИИ И СОПУТСТВУЮЩИМ ВАРИКОЦЕЛЕ

На данном этапе работы было проведено изучение уретральной и тестикулярной микробиоты у 76 мужчин с подтвержденной азооспермией и сопутствующим варикоцеле в возрасте от 23 до 49 лет (средний возраст $28,5 \pm 5,1$ лет).

В зависимости от диагноза исследуемые пациенты были разделены на три группы. В группу 1 были включены 34 пациента с НОА, группу 2 представлял 21 пациент с ОА, в группу 3 был включен 21 пациент с НОА и сопутствующем варикоцеле (Var).

Исследование было произведено с использованием разработанных нами малоинвазивных методов выделения бактериальной ДНК из биоптата ткани предстательной железы и биоптата тестикулярной ткани

4.1 Разработка метода малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин

Большинство современных методов выделения ДНК из тканей растительного и животного происхождения состоят из последующих этапов: разрушение клеточных стенок; лизис клеточных мембран; очистка от ингибиторов ферментативных реакций (ПЦР, рестрикции). Разрушение клеточных стенок осуществляется механически перетиранием с оксидом кремния (или оксидом алюминия) или с использованием жидкого азота.

На сегодняшний день в доступной научной литературе имеется лишь одно сообщение о выделении микроорганизмов из тестикулярной ткани. Тем не менее, описание, особенно касающееся подготовительного этапа извлечения бактериальной ДНК из нативного биоптата яичковой ткани, пригодного для NGS-секвенирования, является недостаточно информативным. В частности,

отсутствует характеристика использованных сред и буферных растворов, а также не указаны концентрации, время экспозиции и режимы центрифугирования, необходимые для получения достаточного объема бактериальной ДНК из тестикулярного материала.

Нами разработан и апробирован в рамках настоящего исследования метод выделения бактериальной ДНК у инфертильных мужчин из тестикулярной ткани путем биопсии яичка.

В операционных условиях, по стандартной методике биопсии яичка производили забор тестикулярной ткани у пациентов. Ткань помещали в стерильный физиологический раствор интраоперационно и обрабатывали для хранения в стерильных условиях в течение 30 минут при температуре криодиссекции не более -30° . Все процедуры выполняли в стерильных условиях, с использованием одноразовых материалов и оборудования. По завершении оперативного пособия проводили забор образца, отделяемого слизистой оболочки уретры (мазки), используя стабилизационный буфер и комплект для выделения ДНК из эпителия уретры.

Следующим этапом проводили очистку интактной ДНК из тестикулярной ткани с помощью набора TheReliaPrep™ gDNATissueMiniprepSystem, Promega (США), что обеспечивало быструю и простую очистку интактной ДНК из тестикулярной ткани.

Образцы выделяли с использованием мини-колонок в настольной микроцентрифуге. Геномная ДНК, выделенная таким способом, имеет высокое качество и может быть использована в ПЦР-анализе. К каждому образцу тестикулярного биоптата добавляли 160 мкл ТЕ-буфера, затем 20 мкл лизоцима с концентрацией 50 мг/мл.

В рамках вышеописанного метода предложено использовать предварительную инкубации лизоцимом в ТЕ буфере для разрушения бактериальной клеточной стенки. Лизоцим вносили в объеме 20 мкл из стокового раствора с концентрацией 50 мг/мл согласно методу Бирнбойма-Доли [57]. Обработка лизоцимом способствует увеличению выхода бактериальной ДНК.

Содержимое пробирок тщательно перемешивали на вортексе и осаждали путем центрифугирования. Затем проводили инкубацию в термостате при 37°C в течение 1-2 часов.

К гомогенизированному образцу добавляли 20 мкл раствора Протеиназы К (РК) и 200 мкл Лизис-буфера с целью лизиса клеток в пробирке, осуществляли перемешивание на вортексе в течение 10 с. Затем вновь инкубировали при 56°C в течение 2 ч. После этого добавляли по 20 мкл раствора РНКазы А к каждому образцу, перемешивали на вортексе в течение 10 с с последующим инкубированием в термостате при 56°C в течение 10 минут.

Следующим этапом добавляли в извлеченные пробирки из термостата 250 мкл связывающего буфера (ВВА), вортексировали в течение 1 минуты с последующим кратким центрифугированием.

Связывающие колонки помещали внутрь пробирки для каждого образца, переносили часть жидкости образца на связывающую колонку, с последующим центрифугированием в течение 1 минуты на скорости 3000 оборотов в минуту. При наличии лизата сверху на мембране центрифугировали колонки в течение 1 минуты. Затем извлекали пробирки с протекшей жидкостью и перемещали связывающую колонку в новую пробирку с последующим добавлением 500 мкл раствора для промывки колонок (СWD) в колонку. Производили центрифугирование в течение 2 минут на скорости 3000 об/мин, затем отделяли протекшую жидкость. Данный этап повторяли дважды, после чего помещали колонку в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и добавляли 50 мкл воды без нуклеаз в колонку. Производили центрифугирование в течение 1 минуты на максимальной скорости. После удаления связывающей колонки сохраняли элюат с целью последующего секвенирования методом NGS.

По результатам апробации методы было предложено использовать в центрах ВРТ с целью лечения бесплодия у инфертильных мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза.

Разработанная нами прецизионная технология выделения бактериальной ДНК из ткани биоптата яичка позволяет усовершенствовать подходы к

характеристике микробиоты тестикулярной ткани и тем самым усовершенствовать подходы к оценке мужского репродуктивного потенциала. Предложенный комплекс мероприятий позволил обосновать алгоритм выбора тактики преодоления мужской инфертильности, в том числе путем эффективного применения ВРТ.

Клинический пример 1

Пациент С., 1982 г.р.

Обратился в Центр Репродукции с жалобами на отсутствие наступления беременности у супруги более 7 лет без применения средств контрацепции.

В первом браке один ребенок. Супруга, 29 лет. 1-я попытка ЭКО – без успеха.

Анамнез жизни: перенесенные заболевания отрицает, проф. вредности отрицает, половая жизнь с 15 лет, в настоящее время регулярная. Посещение бани - редко.

Ранее по поводу бесплодия неоднократно лечился, без успеха.

По результатам обследования по стандарту центра ВРТ в спермограмме – азооспермия.

AZF-, CFTR -мутаций не выявлено, кариотипирование – 46XY (норма).

Исследование эякулята на бактериальную флору: микрофлора не выделена. Бактериальный посев секрета простаты: микрофлора не выделена. ПЦР на ИППП: микрофлора не выделена.

Диагноз: Мужской фактор бесплодия. Необструктивная азооспермия. Хронический простатит в стадии латентного воспаления.

В условиях операционной по стандартной методике биопсии яичка произведен забор тестикулярной ткани у пациента. Ткань помещена в стерильный физиологический раствор, обработана для хранения в стерильных условиях в течение 30 минут при температуре криодиссекции -30° С. Все процедуры выполняли в стерильных условиях с использованием одноразовых материалов и оборудования.

По завершению оперативного пособия был осуществлен забор образца,

отделяемого слизистой оболочки уретры (мазки) с использованием стабилизационного буферного раствора и комплекта для выделения ДНК из эпителия уретры вышеописанным методом.

В результате была определена разновидность 146 таксонов микробиоты урогенитального тракта из тестикулярной ткани и уретры пациента при наличии стерильных посевов, выполненных стандартным методом. Это позволило скорректировать алгоритм лечения и осуществить санацию урогенитального тракта мужчины путем проведения антибактериальной химиотерапии.

Использование вышеизложенного подхода обеспечило правильный выбор тактики и осуществления прогноза результатов использования ВРТ, что позволило сократить время лечения и реабилитации и достичь положительного результата – беременности партнерши.

Клинический пример 2

Пациент К., 1982 г.р. Обратился в Центр Репродукции с жалобами на бесплодный брак более 3 лет. Предыдущие 2 попытки ЭКО без успеха. Пара готовится вновь для проведения протокола ЭКО в связи с мужским фактором бесплодия.

Анамнез. Первый брак. Детей в браках ранее не было. Супруга – 27 лет, беременностей не было. Перенесенные заболевания ИППП – клинически санированы. Профессиональные вредности отрицает. Половая жизнь с 16 лет.

В настоящее время половая жизнь регулярная, без применения средств контрацепции (2-3 раза в неделю). Посещение бани – редко. Ранее по поводу бесплодия лечился без эффекта с диагнозом МБ-1 Азооспермия.

Результаты обследования. Спермограмма – азооспермия. AZF-, CFTR-мутаций не выявлено. При оценке уровней гормонов в плазме крови: Тс, ЛГ, ФСГ, пролактин – вариант нормы. Уровень ингибина В – 319 пг/мл (норма).

Исследование эякулята на бактериальную флору: микрофлора не выделена. Бактериальный посев секрета простаты: микрофлора не выделена.

Проведен забор биологического материала из тестикулярной ткани и уретры, инкубирование в термостате при 37°C в течение 2 ч. Выявлено наличие

возбудителей ИППП в невысоком бактериальном титре *Ureaplasma urealiticum* и неспецифической инфекции *E. coli* в минимальном титре, а также 191 таксон разновидности урогенитального микробиома.

Данная клиническая картина потребовала дополнительной предоперационной подготовки и обусловила изменение тактики ведения пациента, что позволило в последующем сократить срок реабилитации пациента и затраты на лечение.

Достигнут положительный результат протокола ВРТ – прогрессирующая беременность и возможность криоконсервации здоровых эмбрионов.

4.2 Таксономический состав микробиоты уретры

В анализируемых образцах выделены основные филы: *Bacteroidota*, *Firmicutes_C*, *Patescibacteria*, *Fusobacteriota* и *Desulfobacterota_I*. Каждому филу присвоены средние значения с оценкой вариативности. Данные показывают значительные различия в относительной репрезентативности между группами, особенно для *Bacteroidota* и *Firmicutes_C*, где наблюдается высокая статистическая значимость, на что указывают величины *p*. Общее распределение микробиоты демонстрирует, что состав и разнообразие микроорганизмов в уретре может зависеть от состояния здоровья пациентов, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения взаимосвязи между микробиотой и патологическими состояниями.

Таблица 4.1 – Показатели относительной репрезентативности фил (%) в образцах микробиоты уретры, $M \pm m$

Филы	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Вап), n=21	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
<i>Bacteroidota</i>	6,78±1,82	14,75±2,17	16,81±1,91	0,10	<0,01	0,09
<i>Firmicutes_C</i>	3,80±0,74	3,30±0,66	7,69±0,93	1,00	0,02	0,02
<i>Patescibacteria</i>	0,31±0,05	0,01±0,01	0,15±0,03	0,48	0,02	0,02

Продолжение таблицы 4.1

Филы	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Ваp), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Fusobacteriota	1,00±0,18	0,04±0,01	0,46±0,14	0,51	0,02	0,02
Desulfobacterota_I	0	0,01±0,01	0,12±0,04	0,56	<0,01	0,01

На уровне семейств выявлен ряд таксонов с выраженными межгрупповыми различиями. Таблица 4.2 предоставляет данные о показателях относительной репрезентативности различных семейств микроорганизмов в образцах микробиоты уретры, выраженных в процентах. Данные группируются по трем различным группам образцов: первой группе (НОА), состоящей из 34 образцов, второй группе (ОА) с 21 образцом и третьей группе (Ваp), также с 21 образцом.

Таблица 4.2 демонстрирует разнообразие и относительные пропорции семейств, таких как Bacteroidaceae, Streptococcaceae и Micrococcaceae, среди других. Указанные значения показывают средние данные с учетом вариаций, обозначенных как $M \pm m$. Статистическая значимость различий между группами также указана через p-значения, что позволяет показать, где были обнаружены статистически значимые отличия.

Такая структура таблицы обеспечивает четкое и организованное представление о составе микробиоты в различных группах, что может иметь важное значение для дальнейшего анализа и интерпретации данных в контексте влияния этих микроорганизмов на здоровье и патогенез.

Таблица 4.2 – Показатели относительной репрезентативности семейств (%) в образцах микробиоты уретры, $M \pm m$

Семейства	Группа 1 (НОА) n=34	Группа 2 (ОА) n=21	Группа 3 (Ваp) n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Bacteroidaceae	5,74±0,51	13,12±2,97	12,42±1,71	0,20	0,01	0,19
Streptococcaceae	9,35±1,52	0,80±0,18	4,59±0,41	0,27	0,03	0,01
Micrococcaceae	0,49±0,13	0,86±0,15	2,18±0,22	0,99	0,04	0,04
Lachnospiraceae	1,66±0,33	0,27±0,05	2,16±0,60	0,60	<0,01	<0,01

Продолжение таблицы 4.2

Семейства	Группа 1 (НОА) n=34	Группа 2 (ОА) n=21	Группа 3 (Var) n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Weeksellaceae	0,27±0,05	0,10±0,03	1,52±0,30	0,36	0,03	0,18
Porphyrromonadaceae	0,16±0,02	1,16±0,02	1,46±0,37	0,21	<0,01	0,03
Acutalibacteraceae	0,03±0,01	0,10±0,02	0,78±0,16	0,15	<0,01	0,01
Ruminococcaceae	0,14±0,02	0,07±0,01	0,30±0,06	0,77	0,04	0,08
Negativicoccaceae	0,49±0,11	0,88±0,16	2,90±0,61	0,99	0,03	0,03
Enterococcaceae	0,28±0,07	0,12±0,02	1,52±0,26	0,82	0,04	0,02
Fusobacteriaceae_993521	0,39±0,09	0	0,37±0,07	0,46	0,01	<0,01
Flavobacteriaceae	0,05±0,02	0	0,06±0,01	0,31	0,12	0,04
Coprobacillaceae	0,08±0,03	0,03±0,01	0,23±0,05	1,00	<0,01	0,01
Brevibacteriaceae	0,12±0,04	0	0,26±0,07	0,29	0,14	0,04
Peptostreptococcaceae_256921	0,09±0,02	0,14±0,5	0,41±0,08	0,29	<0,01	0,06
Oscillospiraceae_88309	0,01±0,01	0,04±0,1	0,17±0,04	0,89	0,03	0,04
Microbacteriaceae	0,22±0,06	0,03±0,1	0,29±0,08	1,00	0,05	0,047
Helicobacteraceae	0,03±0,01	0,01±0,01	0,44±0,12	0,85	0,01	0,02
o__Bacteroidales, f__	0,00±0,00	0,11±0,03	0,15±0,05	0,22	0,01	0,21
Rikenellaceae	0,01±0,01	0,00	0,30±0,06	0,87	<0,01	<0,01
Desulfovibrionaceae	0	0,01±0,01	0,12±0,04	0,56	<0,01	0,01
o__Christensenellales, f__ CAG-74	0	0,02±0,01	0,07±0,01	0,33	0,03	0,23
c__Clostridia_258483,o__ UBA1381,f__UBA1381	0	0	0,07±0,01	0,52	0,02	0,08
Tannerellaceae	0,01±0,01	0	0,15±0,04	0,72	<0,01	<0,01

При оценке альфа-разнообразия, характеризующего видовое богатство микробиоты, наименьшие значения зафиксированы в группе пациентов с ОА (группа 2), тогда как наиболее высокое микробное разнообразие выявлено в группе пациентов с НОА и сопутствующим варикоцеле (группа 3). Показатели альфа-разнообразия в группе пациентов с НОА без варикоцеле (группа 1) занимают промежуточное положение между указанными группами. Статистически значимые различия установлены при сравнении группы 3 с группой 1, а также группы 3 с группой 2, что может свидетельствовать о потенциальной ассоциации варикоцеле с повышенным микробным разнообразием уrogenитального тракта. Различия между группами 1 и 2 не достигли

статистической значимости (подробные количественные данные представлены в Таблице 4.3).

Таблица 4.3 – Показатель альфа-разнообразия относительной репрезентативности таксонов в образцах микробиоты уретры, $M \pm m$

Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Ваp), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
79,00±7,16	49,29±4,62	88,86±7,96	0,72	0,01	0,02

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что ОА ассоциирована с минимальным разнообразием и бедным таксономическим составом уретральной микробиоты, тогда как при НОА, особенно в сочетании с варикоцеле, наблюдается достоверное увеличение как таксономического разнообразия, так и обилия определённых семейств и филов, потенциально ассоциированных с воспалением и дисбиозом. Эти различия могут отражать нарушение местных барьерных механизмов и иммунной регуляции на фоне варикоцеле, что требует дальнейшего изучения с позиций патогенеза мужского бесплодия и возможных микробиом-модулирующих стратегий.

4.3 Частота встречаемости различных представителей микробиоты уретры

Сравнение качественных данных (наличие либо отсутствие таксона в образце), показало, что НОА и ОА различаются частотой встречаемости только филов Bacteroidota, при сравнении видового состава микроорганизмов у пациентов с варикоцеле и группами пациентов с азооспермией невозможно выделить определенные филов в силу их широкого разнообразия.

Сравнительный анализ качественного состава уретральной микробиоты, проведённый на основании частоты встречаемости таксонов (наличие/отсутствие в образцах), выявил существенные различия между группами пациентов с различными формами азооспермии и наличием варикоцеле (Таблица 4.4). Среди представленных таксонов наибольшее распространение имеет Bacteroidota,

который наблюдается у большинства пациентов первой группы и у всех представителей вторых и третьих групп, что указывает на его высокую распространенность в исследуемых популяциях. Таксон Firmicutes_C проявляет значительное присутствие в третьей группе, в то время как в первых двух группах наблюдаются значительно более низкие уровни. Таксон Fusobacteriota имеет относительно низкие уровни выявления в первых и вторых группах и демонстрирует заметное увеличение в третьей группе. Наконец, Desulfobacterota_I представлен во второй группе с некоторым уровнем, который существенно возрастает в третьей группе.

В Таблице 4.4 также представлены данные статистического анализа, указывающие на значимость различий в распределении бактериальных филов между группами. Например, для сопоставления первой и второй групп для Firmicutes_C имеются статистически значимые различия, в то время как для других сравнений наблюдаются незначительные различия.

Общий анализ данных подчеркивает разнообразие бактериальной флоры в уретре и её связь с выбранными группами пациентов, что может иметь значение для понимания патогенеза и подходов к терапии в урологии.

Таблица 4.4 – Частота выявления бактериальных таксонов (филы) в уретре в группах сравнения, %

Филы	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Ваp), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Bacteroidota	70,6	100,0	100,0	0,01	0,01	1,00
Firmicutes_C	52,9	57,1	95,2	0,79	<0,01	0,01
Fusobacteriota	20,6	14,3	52,4	0,72	0,03	0,03
Desulfobacterota_I	0	4,8	28,6	0,38	0,01	0,14

На уровне семейств различия оказались ещё более выраженными. Таблица 4.5 представляет собой анализ частоты выявления различных бактериальных таксонов (семейства) в уретре среди трех групп сравнения. Данные показывают,

что в группе с высочайшей частотой (группа 3) наблюдается значительное преобладание нескольких таксонов, таких как Bacteroidaceae, Burkholderiaceae и Streptococcaceae, в сравнении с другими группами.

Таблица 4.5 – Частота выявления бактериальных таксонов (семейства) в уретре в группах сравнения, %

Семейства	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Вап), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Bacteroidaceae	61,8	85,7	95,2	0,11	0,03	0,61
Burkholderiaceae_A_580492	38,2	42,9	76,2	0,78	0,03	0,09
Streptococcaceae	44,1	33,3	81,0	0,57	0,02	0,01
Lachnospiraceae	35,3	52,4	85,7	0,27	<0,01	0,06
Pseudomonadaceae	17,6	28,6	52,4	0,50	0,04	0,31
Porphyromonadaceae	17,6	33,3	71,4	0,21	<0,01	0,04
Acutalibacteraceae	8,8	28,6	61,9	0,07	<0,01	0,07
Fusobacteriaceae_993521	11,8	4,8	42,9	0,64	0,03	0,03
Coprobacillaceae	8,8	9,5	42,9	1,00	0,02	0,049
Peptostreptococcaceae_256921	5,9	19,0	42,9	0,19	<0,01	0,19
Helicobacteraceae	2,9	4,8	28,6	1,00	0,03	0,14
o__Bacteroidales; __	0	9,5	23,8	0,21	0,02	0,41
Rikenellaceae	2,9	4,8	38,1	1,00	<0,01	0,03
Desulfovibrionaceae	0	4,8	28,6	0,38	0,01	0,14
Tannerellaceae	2,9	0	28,6	1,00	0,03	0,03

Таким образом, сравнительный анализ качественного состава уретральной микробиоты подтверждает гипотезу о наличии выраженных микробиологических различий у пациентов с варикоцеле по сравнению с обеими формами азооспермии. При этом данные пациентов 1 группы (НОА) и 2 группы (ОА) демонстрируют относительное сходство по наличию/отсутствию большинства таксонов, за исключением Bacteroidota.

Широкий спектр филлов и семейств, достоверно чаще встречающихся при варикоцеле, указывает на возможное нарушение микробной гомеостази в уретре на фоне венозного застоя и локального воспаления, что требует дальнейшего изучения в рамках патогенеза мужского бесплодия.

4.4 Таксономический состав микробиоты ткани яичка

Анализ таксономического состава микробиоты ткани яичка выявил статистически значимые различия в альфа-разнообразии и относительной репрезентативности таксонов между пациентами с НОА (группа 1), ОА (группа 2) и НОА в сочетании с варикоцеле (группа 3).

На таксономическом уровне фил. выявлены значимые различия как в составе доминирующих фил, так и в распределении отдельных семейств бактерий (Таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Показатели относительной репрезентативности фил. (%) в образцах микробиоты яичка, $M \pm m$

Филы	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Var), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Actinobacteriota	8,30±0,94	19,46±1,71	16,81±1,98	0,01	0,01	0,84
Proteobacteria	65,09±3,60	34,06±2,19	44,32±3,96	<0,01	0,01	0,45
Firmicutes_D	8,99±1,31	16,57±1,85	13,93±1,34	0,03	0,047	0,74
Firmicutes_A	5,63±0,32	8,15±0,97	8,58±0,82	0,049	0,04	0,77
Bacteroidota	3,45±0,33	9,93±1,38	6,05±0,22	0,01	0,01	0,66
Firmicutes_C	0,95±0,18	1,58±0,28	1,63±0,99	0,04	0,04	0,79
Deinococcota	0,14±0,03	0,33±0,08	0,31±0,04	0,17	0,01	0,23

Наиболее выраженное различие наблюдается в составе Proteobacteria, где группа 1 демонстрирует значительно более высокий процент по сравнению с группами 2 и 3. Кроме того, Firmicutes и Bacteroidota также показывают статистически значимые различия, что может указывать на возможные

функциональные отличия микробиоты яичка в зависимости от состояния группы. Хотя для некоторых филумов, таких как Firmicutes_C и Deinococcota, различия не достигают статистической значимости, результаты подчеркивают сложность и вариативность микробиоты в разных условиях.

Эти данные могут способствовать дальнейшему изучению роли микробиоты в репродуктивном здоровье и открывают новые перспективы для понимания влияния различных факторов на состав микробиоты яичка.

На уровне семейств выявлены множественные статистически значимые различия (Таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Показатели относительной репрезентативности семейств (%) в образцах микробиоты яичка, $M \pm m$

Семейства	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Ваp), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Mycobacteriaceae	4,34±0,25	9,78±1,72	7,48±0,21	0,03	0,01	0,97
Peptoniphilaceae	3,06±0,38	5,40±0,90	4,37±0,32	0,01	0,01	0,91
Bacteroidaceae	1,18±0,05	3,81±0,70	2,20±0,66	0,08	0,03	0,57
Staphylococcaceae	3,59±0,42	4,28±0,28	5,55±0,80	0,34	0,02	0,19
Streptococcaceae	1,23±0,11	6,07±0,82	2,01±0,19	<0,01	0,01	0,58
Lactobacillaceae	1,71±0,15	1,91±0,34	3,53±0,46	0,09	0,04	0,58
Micrococcaceae	1,60±4,49	2,12±0,18	3,60±0,82	0,10	<0,01	0,15
Moraxellaceae	2,32±0,19	1,89±0,12	3,94±0,83	0,64	0,02	0,07
Pseudomonadaceae	0,94±0,06	1,55±0,22	1,64±0,57	0,35	<0,01	0,04
Weeksellaceae	0,44±0,02	1,14±0,16	1,01±0,21	0,01	<0,01	0,37
Porphyromonadaceae	0,33±0,06	0,34±0,07	0,48±0,06	0,26	0,02	0,25
Acutalibacteraceae	0,14±0,03	0,58±0,06	0,63±0,07	0,45	0,01	0,07
Dermabacteraceae	0,16±0,04	0,82±0,09	0,17±0,02	0,02	0,25	0,23
Pasteurellaceae	0,14±0,06	1,20±0,12	0,41±0,03	0,12	<0,01	0,19
Sphingomonadaceae	0,42±0,09	0,39±0,08	0,37±0,06	0,36	0,03	0,22
Enterococcaceae	0,07±0,01	0,04±0,01	0,27±0,09	0,86	<0,01	0,01
Flavobacteriaceae	0,11±0,02	0,46±0,09	0,45±0,07	0,07	0,02	0,54
Alcanivoracaceae	0,07±0,04	0,12±0,02	0,49±0,08	0,33	<0,01	0,01
Sphingobacteriaceae	0,04±0,02	0,56±0,04	0,40±0,04	0,24	<0,01	0,02
Beijerinckiaceae	0,56±0,06	0,14±0,05	0,71±0,05	0,28	0,03	0,01

Продолжение таблицы 4.7

Семейства	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Ваp), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Bacillaceae_H_294103	0,10±0,03	0,01±0,01	0,18±0,04	0,61	<0,01	<0,01
c__Alphaproteobacteria. __.	0,11±0,03	0,21±0,04	0,27±0,01	0,37	0,02	0,14
Marinococcaceae	0,04±0,01	0,14±0,02	1,16±0,18	0,41	0,03	0,18
Nitrococcaceae	0	0,04±0,01	1,41±0,11	0,59	<0,01	<0,01
Nanopelagicaceae	0,02±0,01	0,50±0,05	0,01±0,01	<0,01	0,52	0,03
Helicobacteraceae	0	0,03±0,01	0,42±0,08	0,51	0,01	0,04
Deinococcaceae	0,13±0,04	0,28±0,03	0,18±0,03	0,17	0,02	0,32
Legionellaceae_A	0,06±0,01	0,27±0,03	0,03±0,01	0,047	0,74	0,09
Gemmatimonadaceae	0,07±0,01	0,18±0,04	0,12±0,05	0,04	0,80	0,07
Propionibacteriaceae	0,05±0,01	0,02±0,01	0,14±0,02	0,98	0,01	0,01
Rhizobiaceae_A_499470	0,02±0,01	0,07±0,01	0,28±0,07	0,76	<0,01	<0,01
Listeriaceae	0	0,06±0,02	0,10±0,02	0,30	0,04	0,27
Vibrionaceae	0	0	0,12±0,02	1,00	<0,01	<0,01
Gaiellaceae	0	0,21±0,05	0,04±0,01	0,03	0,33	0,23
Blastocatellaceae_430966	0	0,15±0,03	0,01±0,01	0,02	0,52	0,08

Результаты демонстрируют значительное разнообразие в составе семейств микробиоты, причем многие из них показывают статистически значимые различия между группами. Например, семейства *Mycobacteriaceae*, *Peptoniphilaceae* и *Streptococcaceae* имеют явные отличия в относительной частоте между группами, что может свидетельствовать о влиянии условий, благоприятствующих или подавляющих развитие определенных таксономических групп.

Некоторые другие семейства, такие как *Lactobacillaceae* и *Micrococcaceae*, не демонстрируют значимых различий, что может указывать на стабильность их репрезентативности в разных состояниях. Важно отметить, что данные о значимости различий позволяют выделить ключевые семейства, которые могут играть значительную роль в патологии или норме на уровне репродуктивного здоровья.

Таким образом, изучение относительной репрезентативности семейств в

микробиоте яичка открывает новые перспективы для дальнейшего анализа роли микробиоты в контексте репродуктивного здоровья, а также подчеркивает необходимость более глубоких исследований для понимания взаимосвязи между составом микробиоты и состоянием здоровья.

Показатели альфа-разнообразия, включая phylogenetic diversity по Faith, число наблюдаемых таксонов (observed features), индекс Шеннона и индекс Симпсона, демонстрируют достоверное увеличение микробного разнообразия в последовательности от группы 1 (НОА) к 2 (ОА) и далее к группе 3 (НОА с варикоцеле) (Таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Значимые различия относительной репрезентативности таксонов (%) в образцах микробиоты ткани яичка, $M \pm m$

Альфа-разнообразие	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Var), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
faith_pd	31,59±1,66	46,32±4,78	88,82±8,82	0,046	<0,01	0,08
observed_features	63,32±2,10	99,90±7,98	180,57±9,12	0,04	<0,01	0,02
shannon_entropy	3,41±0,64	4,51±0,98	4,95±0,22	0,047	<0,01	0,21
simpson	0,78±0,06	0,89±0,07	0,86±0,15	0,046	0,02	0,61

Наиболее выраженные различия отмечены между пациентами 1 группы (НОА) и 3 группы (НОА с варикоцеле): у пациентов с варикоцеле наблюдается почти трёхкратное повышение phylogenetic diversity, а также значительное увеличение числа уникальных таксонов и более равномерное их распределение. Эти данные указывают на более сложную и устойчивую микробную экосистему в ткани яичка у пациентов с варикоцеле по сравнению с менее разнообразной микробиотой при изолированной НОА (группа 1), что может отражать неблагоприятные микроэкологические условия, связанные с нарушением тканевой перфузии, оксидативным стрессом или хроническим воспалением.

Полученные результаты указывают на то, что микробиота ткани яичка обладает высокой чувствительностью к патофизиологическим изменениям, сопровождающим различные формы мужского бесплодия. Характерные

изменения микробного разнообразия и состава при НОА (1 группа), ОА (2 группа) и НОА с варикоцеле (3 группа) могут рассматриваться как потенциальные диагностические и прогностические биомаркеры, а также как мишени для будущих терапевтических вмешательств, направленных на модуляцию локального микробного окружения.

4.5 Частота встречаемости различных представителей микробиоты яичка

Анализ значимых различий частот встречаемости бактериальных таксонов в ткани яичка у пациентов с НОА (1 группа), ОА (2 группа) и варикоцеле (3 группа) выявил четкие тенденции в распространённости как фил, так и семейств бактерий, подтверждённые статистически достоверными различиями по результатам точного критерия Фишера с поправкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга (Таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Частота выявления бактериальных таксонов (фил) в ткани яичка в группах сравнения, %

Филы	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Var), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Actinobacteriota	73,5	95,2	100,0	0,11	0,03	1,00
Firmicutes_C	35,3	66,7	76,2	0,04	0,02	0,73
Fusobacteriota	20,6	33,3	57,1	0,35	0,03	0,32
Deinococcota	8,8	28,6	47,6	0,11	0,01	0,34

Результаты показывают, что таксоны Actinobacteriota, Firmicutes_C и Fusobacteriota присутствуют в различных пропорциях в изучаемых группах. Например, наблюдается тенденция к увеличению частоты выявления Actinobacteriota в группах ОА и Var по сравнению с группой НОА, что может указывать на их возможное значение в патогенезе или патологии. Аналогичные различия отмечаются и для Firmicutes_C и Fusobacteriota, где группы ОА и Var показывают более высокие показатели по сравнению с группой НОА.

Таксон Deinococcota демонстрирует меньшую частоту выявления, однако в

группах ОА и Вар также отмечается заметное увеличение, что может подразумевать их адаптивные механизмы в ответ на специфические условия.

Эти данные подчеркивают важность изучения микробиоты в контексте репродуктивного здоровья и могут служить основой для дальнейших исследований, направленных на понимание роли бактериальных сообществ в здоровье яичка и их взаимосвязь с различными заболеваниями.

На уровне семейств выявлен широкий спектр таксонов с достоверными различиями в частоте обнаружения между группами. В частности, у пациентов 2 группы (ОА) и 3 группы (варикоцеле) существенно выше частота выявления семейств *Mycobacteriaceae*, *Peptoniphilaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* и *Micrococcaceae* по сравнению с НОА (1 группа), при этом доля *Mycobacteriaceae* достигает 100% у пациентов с варикоцеле ($p < 0,01$) (Таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Частота выявления бактериальных таксонов (семейств) в ткани яичка в группах сравнения, %

Семейства	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Вар), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
<i>Mycobacteriaceae</i>	50,0	85,7	100,0	0,01	<0,01	0,23
<i>Peptoniphilaceae</i>	38,2	81,0	90,5	<0,01	<0,01	0,66
<i>Bacteroidaceae</i>	55,9	81,0	90,5	0,12	0,02	0,66
<i>Streptococcaceae</i>	44,1	76,2	85,7	0,04	0,01	0,70
<i>Lactobacillaceae</i>	41,2	76,2	85,7	0,02	0,01	0,70
<i>Micrococcaceae</i>	44,1	71,4	95,2	0,09	<0,01	0,09
<i>Lachnospiraceae</i>	47,1	57,1	90,5	0,58	<0,01	0,049
<i>Aerococcaceae</i>	26,5	42,9	66,7	0,25	0,01	0,25
<i>Veillonellaceae</i>	23,5	52,4	61,9	0,06	0,03	0,76
<i>Moraxellaceae</i>	38,2	52,4	85,7	0,40	<0,01	0,06
<i>Pseudomonadaceae</i>	29,4	42,9	95,2	0,39	<0,01	<0,01
<i>Weeksellaceae</i>	29,4	66,7	85,7	0,02	<0,01	0,28
<i>Neisseriaceae_563222</i>	32,4	52,4	76,2	0,20	0,01	0,20
<i>Porphyromonadaceae</i>	14,7	28,6	52,4	0,30	0,02	0,30
<i>Acutalibacteraceae</i>	23,5	28,6	61,9	0,75	0,03	0,09
<i>Ruminococcaceae</i>	26,5	33,3	61,9/38,1	0,76	0,04	0,18
<i>Pasteurellaceae</i>	5,9	23,8	47,6/52,4	0,14	<0,01	0,20

Продолжение таблицы 4.10

Семейства	Группа 1 (НОА), n=34	Группа 2 (ОА), n=21	Группа 3 (Вар), n=21	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
Xanthomonadaceae_616009	29,4	42,9	76,2/23,8	0,39	<0,01	0,09
Pasteurellaceae	5,9	23,8	47,6/52,4	0,14	<0,01	0,20
Sphingomonadaceae	20,6	38,1	66,7	0,22	<0,01	0,18
Enterococcaceae	2,9	4,8	33,3	1,00	0,01	0,07
Flavobacteriaceae	20,6	42,9	57,1	0,19	0,03	0,54
Alcanivoracaceae	2,9	14,3	47,6	0,15	<0,01	0,06
Sphingobacteriaceae	2,9	14,3	47,6	0,15	<0,01	0,06
Beijerinckiaceae	23,5	9,5	57,1	0,29	0,03	0,01
Bacillaceae_H_294103	8,8	4,8	47,6	1,00	0,01	0,01
c_Alphaproteobacteria	17,6	28,6	57,1	0,50	0,01	0,18
Nitrococcaceae	0	4,8	38,1	0,38	<0,01	0,03
Nanopelagicaceae	5,9/94,1	38,1	14,3	0,01	0,36	0,24
Helicobacteraceae	0,0/100,0	4,8	23,8	0,38	0,02	0,28
Deinococcaceae	5,9/94,1	23,8	38,1	0,14	0,01	0,51
Propionibacteriaceae	8,8/91,2	9,5	42,9	1,00	0,02	0,049
Rhizobiaceae_A_499470	5,9/94,1	9,5	52,4	0,63	<0,01	0,01
Vibrionaceae	0	0	23,8	1,00	0,02	0,07

В целом полученные данные свидетельствуют о выраженных и статистически достоверных изменениях тканевой микробиоты яичка в зависимости от этиологии мужского бесплодия. У пациентов 1 группы (НОА) наблюдается ограниченное присутствие большинства таксонов, тогда как при варикоцеле (группа 3) формируется богатая и разнообразная микробная экосистема с преобладанием специфических семейств. Эти различия могут иметь патогенетическое значение и потенциал для разработки микробиологических биомаркеров и персонализированных терапевтических подходов.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОИСКА ВЗАИМОСВЯЗЕЙ УРОВНЕЙ ГОРМОНОВ, ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБИОТЫ УРЕТРЫ И ТКАНИ ЯИЧКА У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ АЗОСПЕРМИИ И СОПУТСТВУЮЩИМ ВАРИКОЦЕЛЕ

На данном этапе работы была выполнена сравнительная оценка уровней гормонов и шкалы нарушений сперматогенеза у 104 пациентов, которые составили:

- группу 1 (НОА) – 72 пациента с НОА;
- группу 2 (ОА) – 32 пациента с ОА.

Полученные данные были проанализированы на предмет выявления статистически значимых ассоциаций концентраций гормонов, нарушений сперматогенеза и характеристик микробиоты уретры и тканей яичка.

5.1 Показатели гормонального статуса и шкалы нарушений сперматогенеза у пациентов с различными видами азооспермии и сопутствующим варикоцеле

В Таблице 5.1 представлены значения основных показателей, характеризующих гормональный статус и сперматогенез, в зависимости от диагноза между двумя группами: группа 1 (НОА) и группа 2 (ОА). Показатели включают уровни ФСГ, ЛГ, ингибина В, тестостерона и оценку нарушений сперматогенеза.

Таблица 5.1 – Значения показателей в зависимости от диагноза ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 НОА, (n=72)	Группа 2 ОА, (n=32)
ФСГ, Ед/л	6,1±1,2	14,6±3,0*
ЛГ, Ед/л	4,8±1,1	7,3±1,4*
Ингибин В, пг/мл	89,4±5,8	96,4±8,2
Тестостерон, нмоль/л	5,7±1,5	9,6±2,8*

Продолжение таблицы 5.1

Показатель	Группа 1 НОА, (n=72)	Группа 2 ОА, (n=32)
Шкала нарушений сперматогенеза	2,3±0,5	3,1±0,6

Сравнительный анализ показывает, что у пациентов из группы ОА наблюдаются значительно более высокие уровни ФСГ, ЛГ и тестостерона по сравнению с группой НОА. Эти различия являются статистически значимыми, что может свидетельствовать о гормональных изменениях, связанных с данным диагнозом. Уровни ингибина В не продемонстрировали значительных различий между группами, что может указывать на его стабильность независимо от состояния пациента.

Оценка нарушений сперматогенеза также показывает тенденцию к увеличению в группе ОА, что может указывать на более выраженные проблемы с данной функцией. Эти результаты подчеркивают важность гормонального фона в контексте диагностики и подходов к лечению нарушений репродуктивной функции и позволяют предполагать наличие различных механизмов, влияющих на сперматогенез в зависимости от диагноза. Данные могут стать основой для дальнейших исследований в области репродуктивной эндокринологии и мужского здоровья.

5.2 Взаимосвязь состава микробиоты уретры с клинико-лабораторными показателями пациентов с необструктивной азооспермией

Результаты поиска взаимосвязей состава микробиоты уретры с клинико-лабораторными показателями у пациентов с НОА представлены в Таблице 5.2. Анализ ассоциаций между таксономическим составом микробиоты уретры и клинико-лабораторными характеристиками у пациентов с НОА выявил ряд статистически значимых корреляционных связей, указывающих на участие уретральных микробных сообществ в регуляции локального гомеостаза и

репродуктивной функции.

Таблица 5.2 – Значимые корреляции между микробиотой уретры и клинико-лабораторными показателями у пациентов с необструктивной азооспермией

Клинический показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
Тестостерон	ASV (общее число)	-0,349	0,003
Тестостерон	Streptomycetaceae	-0,350	0,027
ФСГ	Acutalibacteraceae	-0,386	<0,001
ФСГ	Desulfovibrionaceae	-0,307	<0,001
ФСГ	Lachnospiraceae	-0,302	0,012
ЛГ	Acutalibacteraceae	-0,434	0,009
ЛГ	Lachnospiraceae	-0,366	0,002
ЛГ	Coriobacteriaceae	-0,375	0,019
ЛГ	Microbacteriaceae	-0,315	0,003
ЛГ	Burkholderiaceae_A	-0,320	<0,001
ЛГ	Oscillospiraceae	-0,329	0,031
ЛГ	Coprobacillaceae	-0,308	0,011
Ингибин В	Microbacteriaceae	0,319	0,041
Ингибин В	Negativicoccaceae	0,317	0,008
Ингибин В	Dermabacteriaceae	0,332	0,004
Шкала нарушений сперматогенеза	Burkholderiaceae_A	0,352	0,002

Показатели гонадотропной регуляции оказались тесно связаны с составом микробиоты уретры. Так, уровень ФСГ достоверно отрицательно коррелировал с относительным содержанием Acutalibacteraceae ($R = -0,386$; $p < 0,001$) (Рисунок 5.1), Desulfovibrionaceae ($R = -0,307$; $p < 0,001$) и Lachnospiraceae ($R = -0,302$; $p = 0,012$), а уровень ЛГ – с численностью Acutalibacteraceae ($R = -0,434$; $p = 0,009$), Lachnospiraceae ($R = -0,366$; $p = 0,002$) (Рисунок 5.2), Coriobacteriaceae ($R = -0,375$; $p = 0,019$), Microbacteriaceae ($R = -0,315$; $p = 0,003$), Burkholderiaceae_A ($R = -0,320$; $p < 0,001$), Oscillospiraceae ($R = -0,329$; $p = 0,031$) и Coprobacillaceae ($R = -0,308$; $p = 0,011$). Эти данные могут указывать на гормонозависимую модуляцию микробных сообществ, отражающую изменения в метаболических и иммунных условиях уретральной среды.

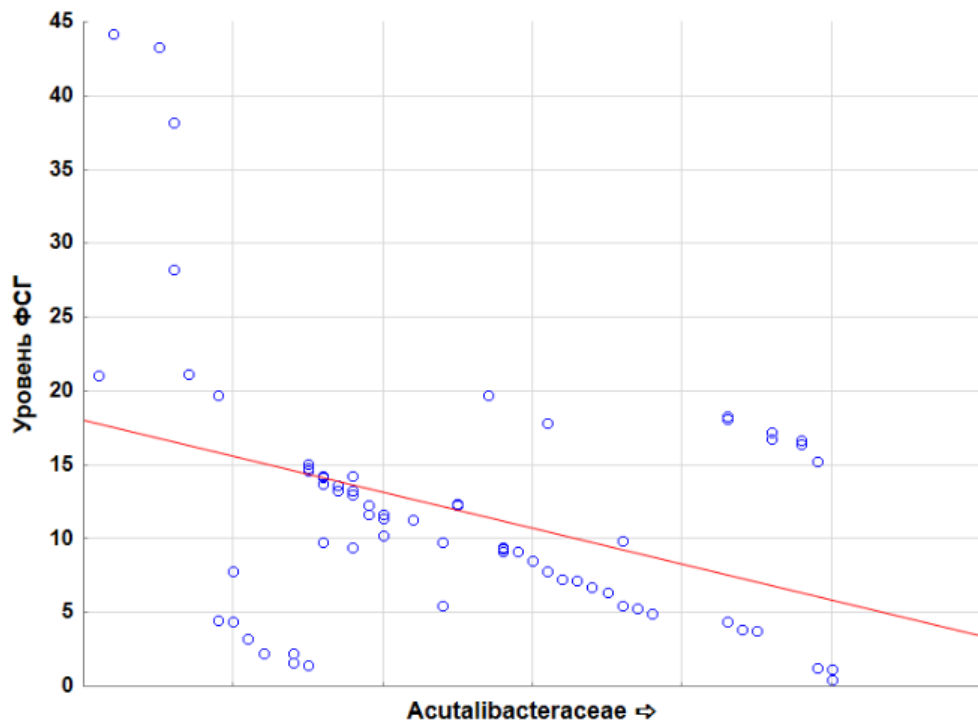


Рисунок 5.1 – Взаимосвязь уровня ФСГ с численностью Acutalibacteraceae

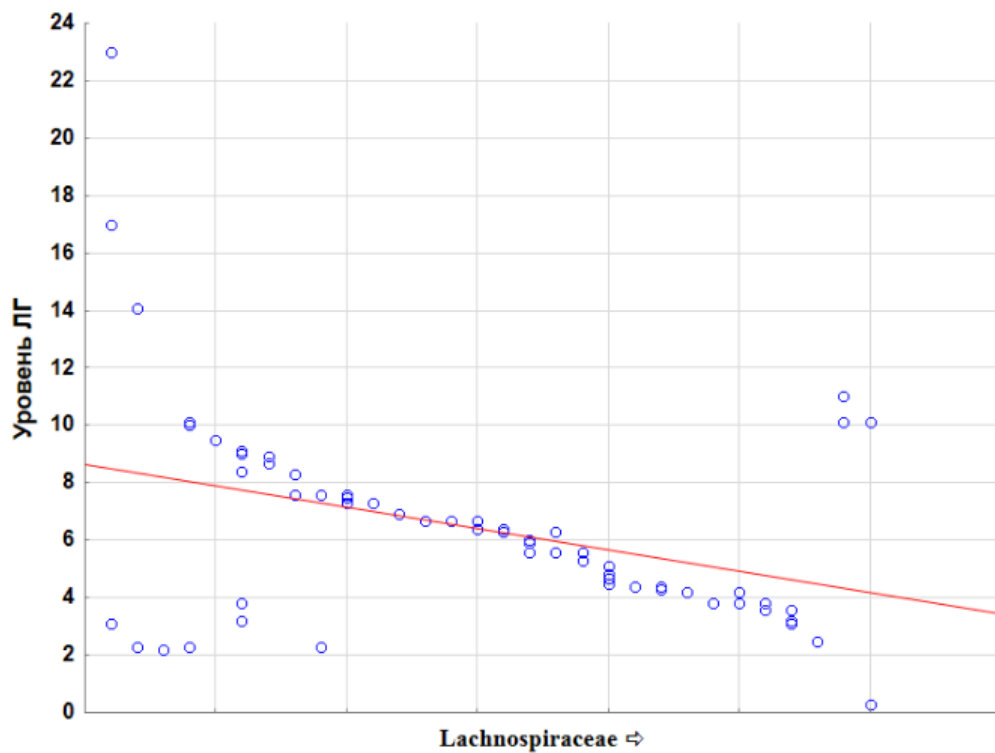


Рисунок 5.2 – Взаимосвязь уровня ЛГ с численностью Lachnospiraceae

Снижение уровня тестостерона оказалось ассоциировано с уменьшением микробного разнообразия в уретральной нише. Установлены достоверные

отрицательные корреляции между уровнем тестостерона и индексами альфа-разнообразия – индексом Симпсона ($R = -0,326$; $p = 0,003$), индексом Шеннона ($R = -0,328$; $p = 0,009$), а также общим числом вариантов ампликонной последовательности (ASV) ($R = -0,349$; $p = 0,003$) (Рисунок 5.3). Кроме того, выявлена отрицательная связь между уровнем тестостерона и численностью представителей семейства *Streptomycetaceae* ($R = -0,350$; $p = 0,027$), что может свидетельствовать о дестабилизации микробной экосистемы при нарушении стероидной продукции.

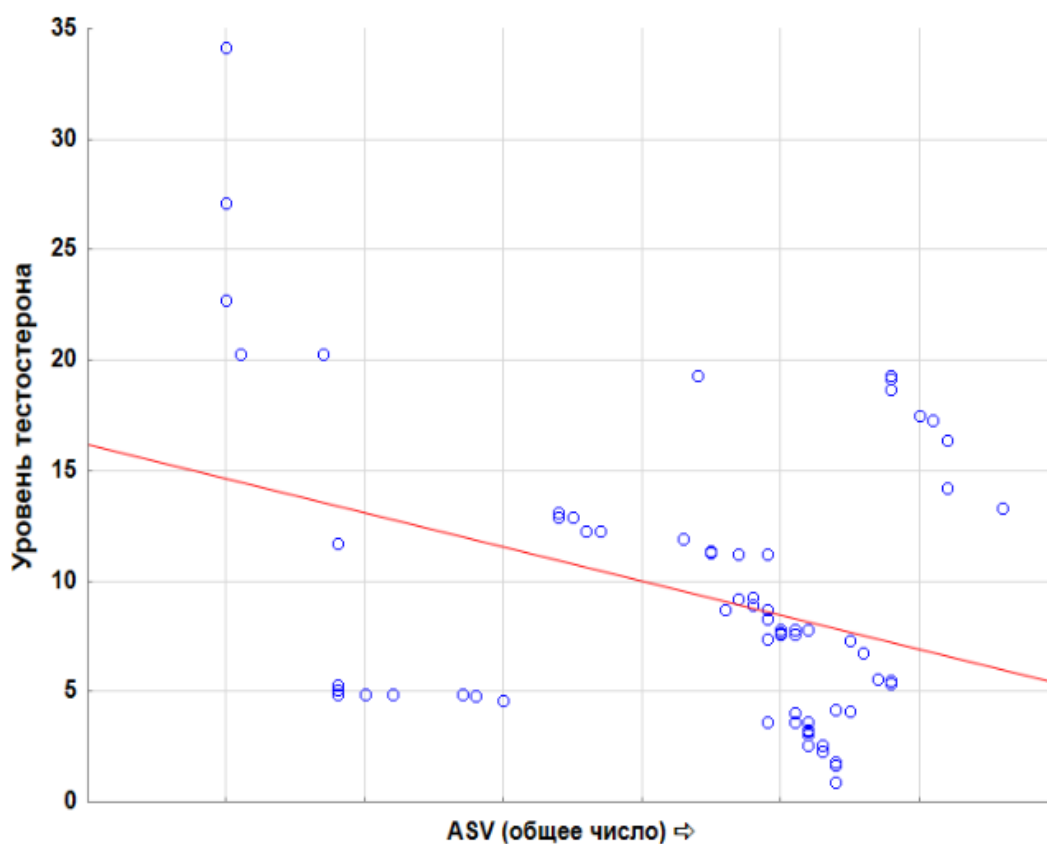


Рисунок 5.3 – Взаимосвязь уровня тестостерона с ASV

Наибольшее количество значимых ассоциаций наблюдается для ингибина В – маркера функции клеток Сертоли. Его уровень положительно коррелировал с численностью представителей таких таксонов, как *Dermabacteraceae* ($R = 0,332$; $p = 0,004$) (Рисунок 5.4), *Microbacteriaceae* ($R = 0,319$; $p = 0,041$), *Negativicoccaceae* ($R = 0,317$; $p = 0,008$), *Burkholderiaceae_A* ($R = 0,285$; $p = 0,025$), *Acutalibacteraceae* ($R = 0,273$; $p = 0,044$) и *Coriobacteriaceae* ($R = 0,261$; $p = 0,019$), что может указывать на наличие специфических микробных профилей, ассоциированных с

сохранённой сперматогенной активностью и иммунологическим контролем в дистальных отделах полового тракта. При этом уровень ингибина В демонстрировал умеренную отрицательную корреляцию с содержанием таксономически неопределённых микроорганизмов (Unassigned) ($R = -0,320$; $p = 0,016$), что может свидетельствовать о снижении микробной специфичности и потенциальном росте условно-патогенной или нерезидентной флоры на фоне нарушения функции клеток Сертоли.

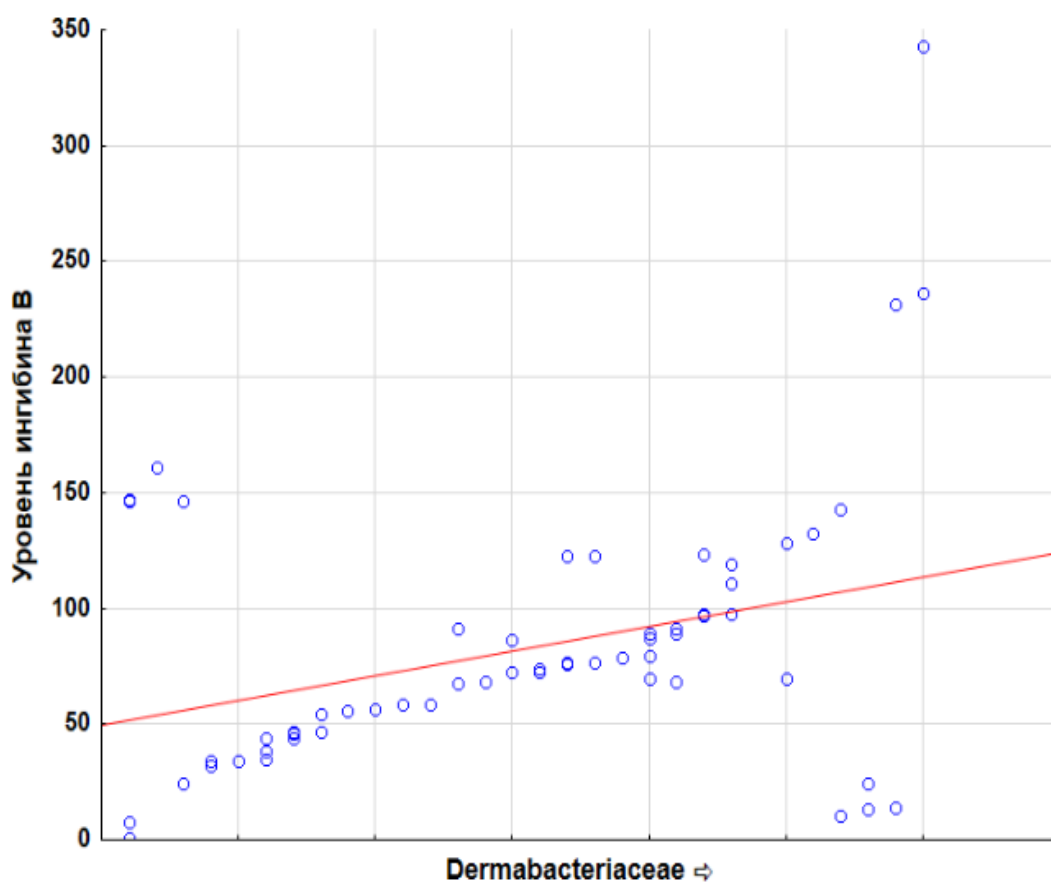


Рисунок 5.4 – Взаимосвязь уровня ингибина В с численностью Dermabacteriaceae

Выраженность изменений, оцененная по шкале нарушений сперматогенеза, также ассоциировалась с особенностями микробного состава уретры. Установлены отрицательные корреляции между баллами по шкале и индексом Симпсона ($R = -0,317$; $p < 0,001$), индексом Шеннона ($R = -0,312$; $p = 0,003$), а также содержанием таксономически неопределённых микроорганизмов Unassigned ($R = -0,282$; $p = 0,011$). Эти данные указывают на снижение

микробного разнообразия и увеличение доли неопределённых таксонов при наличии воспаления. Напротив, положительная корреляция с *Burkholderiaceae_A* ($R = 0,352$; $p = 0,002$) (Рисунок 5.5) подтверждает ранее описанные данные о вовлечённости данного таксона в воспалительные процессы урогенитального тракта и позволяет рассматривать его как возможный микробный маркёр дисрегуляции слизистого иммунного барьера.

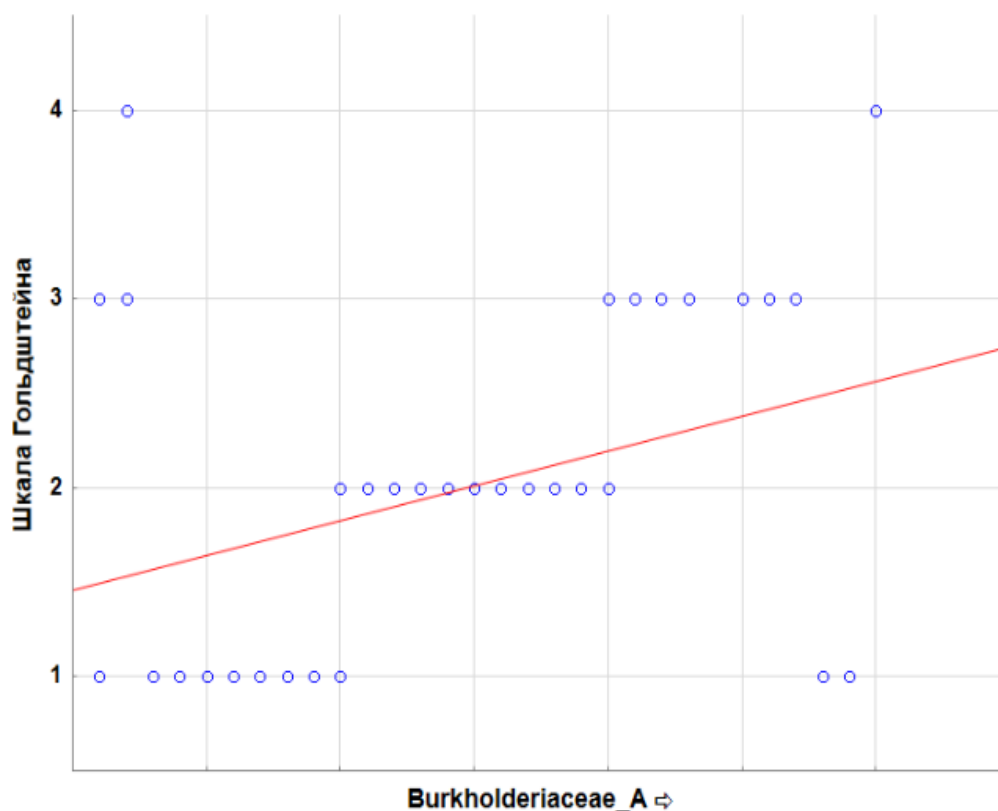


Рисунок 5.5 – Взаимосвязь показателей шкалы нарушений сперматогенеза с численностью *Burkholderiaceae_A*

Таким образом, микробиота уретры у пациентов с НОА демонстрирует сложные и значимые связи с ключевыми параметрами гормонального фона, воспалительного статуса и функциональной активности сперматогенеза. Эти данные подчеркивают потенциальную значимость уретральных микробных сообществ в патогенезе мужского бесплодия и открывают перспективы для дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов микробиомно-эндокринного взаимодействия.

5.3 Результаты поиска взаимосвязей состава микробиоты уретры с клинико-лабораторными показателями пациентов с обструктивной азооспермией

У пациентов с ОА были выявлены статистически значимые ассоциации между таксономическим составом уретральной микробиоты и основными клинико-лабораторными параметрами, характеризующими гормональный профиль, воспалительные изменения и состояние сперматогенеза. Полученные данные подчеркивают потенциальную роль уретральной микробиоты в патогенезе ОА, несмотря на сохранённую сперматогенную функцию при данной форме бесплодия.

Уровень ФСГ демонстрировал положительные корреляции с численностью нескольких бактериальных семейств: Burkholderiaceae_A ($R = 0,419$; $p = 0,018$), Neisseriaceae ($R = 0,409$; $p = 0,010$), Obscuribacteraceae ($R = 0,406$; $p = 0,004$) и Chitinophagaceae ($R = 0,435$; $p = 0,013$) (Таблица 5.3; Рисунок 5.6).

Таблица 5.3 – Значимые корреляции между микробиотой ткани уретры и клинико-лабораторными показателями у пациентов с обструктивной азооспермией

Клинический показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
ФСГ	Burkholderiaceae_A	0,419	0,018
ФСГ	Neisseriaceae	0,409	0,010
ФСГ	Obscuribacteraceae	0,406	0,004
ФСГ	Chitinophagaceae	0,435	0,013
ЛГ	Индекс Симпсона	-0,386	0,029
Ингибин В	Staphylococcaceae	-0,433	0,013
Ингибин В	Bifidobacteriaceae	0,405	0,013
Ингибин В	Veillonellaceae	0,400	0,034
Ингибин В	Neisseriaceae	-0,392	<0,001
Тестостерон	Mycoplasmoidaceae	-0,375	0,034
Шкала нарушений сперматогенеза	Acetobacteraceae	0,373	0,015
Шкала нарушений сперматогенеза	Actinomycetaceae	-0,400	0,021
Шкала нарушений сперматогенеза	Leptotrichiaceae	-0,495	0,004

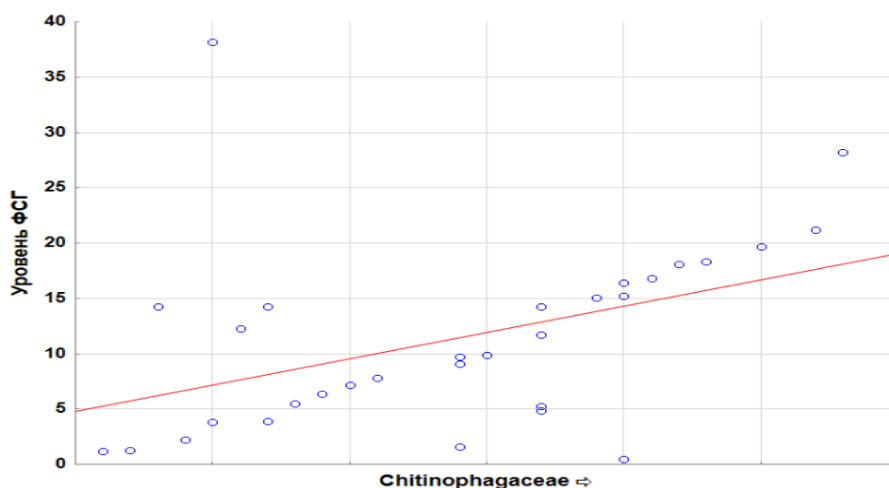


Рисунок 5.6 – Взаимосвязь уровня ФСГ с численностью Chitinophagaceae

Полученные данные отражают связь между гормональной регуляцией и локальной микробной средой уретры, а также потенциальное участие указанных таксонов в процессах регуляции мукозального иммунитета. Особенно интересна положительная связь с Neisseriaceae, учитывая участие представителей этого семейства в колонизации слизистой половых путей и возможную роль в модуляции иммунного ответа. Для лютеинизирующего гормона была установлена отрицательная корреляция с индексом Симпсона ($R = -0,386$; $p = 0,029$) (Рисунок 5.7), что может свидетельствовать о снижении микробного разнообразия при повышенной секреции гонадотропина. Это может отражать системное влияние ЛГ на иммунную регуляцию слизистой оболочки или, напротив, воспалительный отклик, влияющий на состав микробного сообщества.

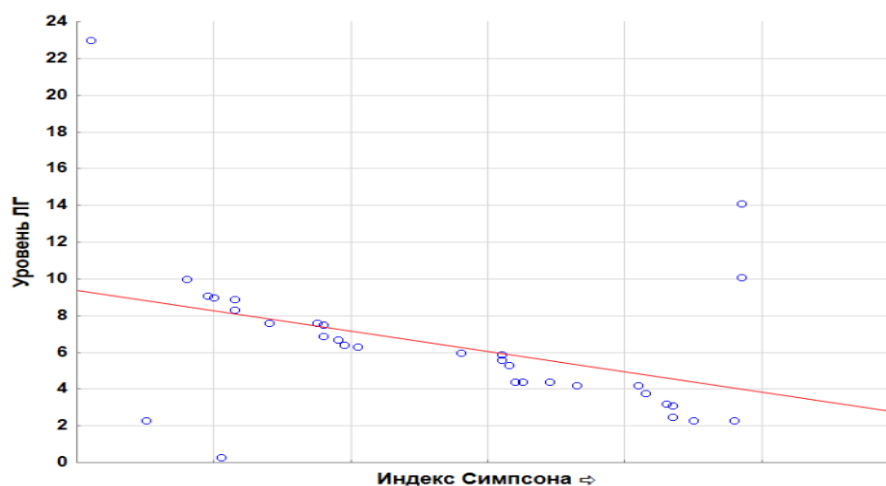


Рисунок 5.7 – Взаимосвязь уровня ЛГ с индексом Симпсона

Показатели, характеризующие функцию клеток Сертоли, также показали определённые ассоциации. Так, уровень ингибина В положительно коррелировал с численностью представителей *Bifidobacteriaceae* ($R = 0,405$; $p = 0,013$) и *Veillonellaceae* ($R = 0,400$; $p = 0,034$), что, возможно, отражает связь между сохранённой сперматогенной активностью и присутствием таксонов с потенциально пробиотическими и противовоспалительными свойствами. В то же время выявлены отрицательные корреляции между ингибином В и численностью *Staphylococcaceae* ($R = -0,433$; $p = 0,013$) (Рисунок 5.8), а также *Neisseriaceae* ($R = -0,392$; $p < 0,001$), что может свидетельствовать о неблагоприятном влиянии данных микробных групп на локальные условия, поддерживающие функциональность клеток Сертоли.

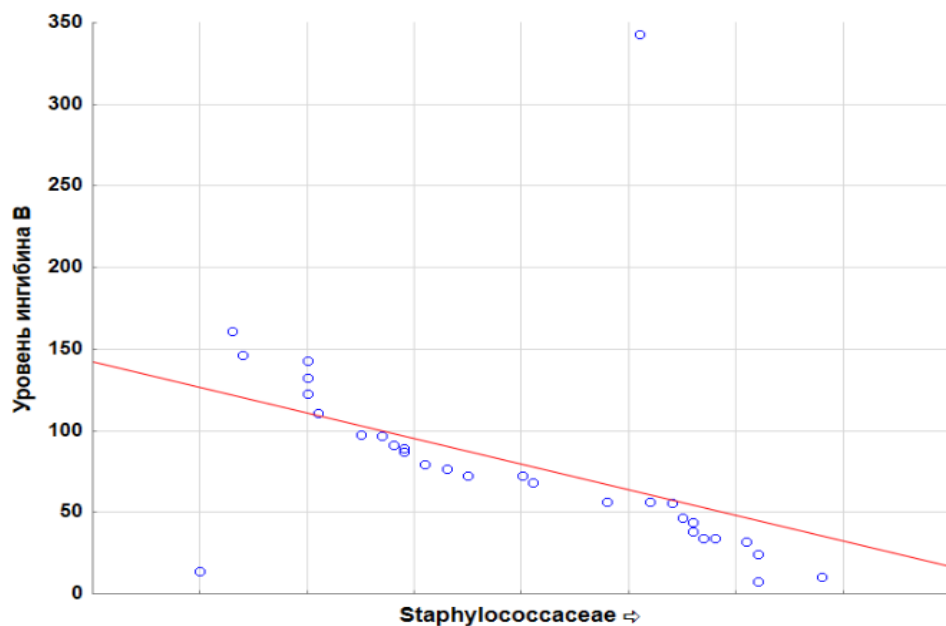


Рисунок 5.8 – Взаимосвязь уровня ингибина В с численностью *Staphylococcaceae*

Уровень тестостерона продемонстрировал отрицательную корреляцию с численностью представителей семейства *Mycoplasmodaceae* ($R = -0,375$; $p = 0,034$) (Рисунок 5.9), что может указывать на возможную связь между снижением андрогенной активности и колонизацией уретры условно-патогенными микоплазмами, известными своим участием в хронических воспалительных процессах уrogenитального тракта.

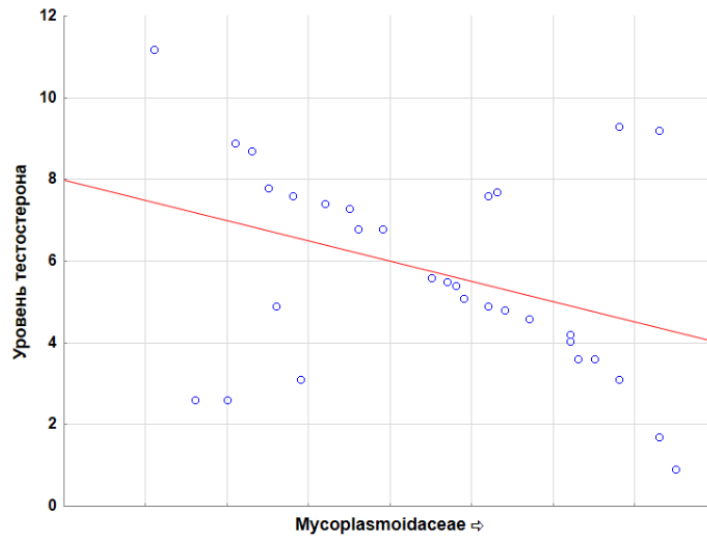


Рисунок 5.9 – Взаимосвязь уровня тестостерона с численностью *Mycoplasmoidaceae*

Выраженность воспалительных изменений, оцененная по шкале нарушений сперматогенеза, также продемонстрировала значимые корреляции с рядом таксонов. Положительная корреляция была выявлена для *Acetobacteraceae* ($R = 0,373$; $p = 0,015$), тогда как отрицательные ассоциации наблюдались с *Actinomycetaceae* ($R = -0,400$; $p = 0,021$) и *Leptotrichiaceae* ($R = -0,495$; $p = 0,004$) (Рисунок 5.10). Последняя из них является наиболее выраженной по степени связи и может указывать на снижение численности определённых бактериальных групп при нарастании воспалительных изменений, вероятно вследствие иммунного ответа или изменения условий уретральной среды.

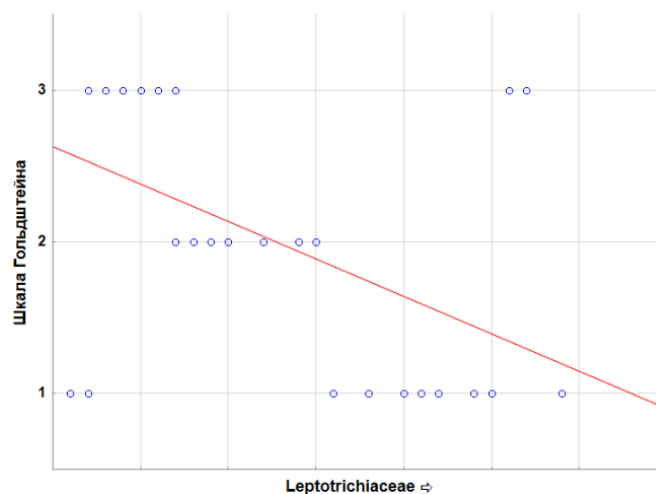


Рисунок 5.10 – Взаимосвязь показателей шкалы нарушений сперматогенеза с численностью *Leptotrichiaceae*

Таким образом, микробиота уретры при ОА характеризуется рядом значимых ассоциаций с уровнями гонадотропинов, андрогенов и маркеров воспаления. Эти данные подтверждают участие уретральной микробной экосистемы в локальной регуляции иммунного баланса и подчеркивают её возможную диагностическую или прогностическую ценность при оценке состояния мужского репродуктивного тракта даже в условиях сохранённого сперматогенеза.

5.4 Результаты поиска взаимосвязей характеристик микробиоты ткани яичка с клинико-лабораторными показателями пациентов с необструктивной азооспермией

Проведённый корреляционный анализ позволил выявить статистически значимые ассоциации между характеристиками микробиоты ткани яичка и клинико-лабораторными параметрами у пациентов с НОА. Установлены многочисленные связи между микробными таксонами и уровнями половых гормонов, маркерами сперматогенеза, а также выраженностью воспалительных изменений.

Как видно из Таблицы 5.4, выявлены отрицательные корреляции между уровнем ФСГ и различными показателями микробного разнообразия и составом тестикулярной микробиоты, что может указывать на возможное подавление локального микробного разнообразия при выраженной гипергонадотропной стимуляции.

Таблица 5.4 – Значимые корреляции между характеристиками микробиоты ткани яичка и клинико-лабораторными показателями у пациентов с необструктивной азооспермией

Показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
ФСГ	Филогенетическое разнообразие	-0,314	0,007
ФСГ	Lactobacillaceae	-0,383	<0,001
ФСГ	Streptococcaceae	-0,357	0,012

Продолжение таблицы 5.4

Показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
ФСГ	Veillonellaceae	-0,332	0,034
ФСГ	Moraxellaceae	-0,340	0,028
ФСГ	Pasteurellaceae	-0,317	0,041
ФСГ	Xanthomonadaceae	-0,312	0,015
ЛГ	ASV (общее число)	-0,312	0,006
ЛГ	Lactobacillaceae	-0,320	0,017
ЛГ	Moraxellaceae	-0,393	<0,001
ЛГ	Porphyromonadaceae	-0,303	0,004
ЛГ	Flavobacteriaceae	-0,400	0,001
ЛГ	Dermatophilaceae	-0,344	0,030
ЛГ	Sphingobacteriaceae	-0,342	0,024
ЛГ	Salinicoccaceae	-0,304	0,046
Ингибин В	Bacteroidaceae	0,409	0,028
Ингибин В	Burkholderiaceae_A	0,445	<0,001
Ингибин В	Pasteurellaceae	0,479	<0,001
Ингибин В	Aerococcaceae	0,318	0,016
Ингибин В	Acutalibacteraceae	0,375	0,004
Ингибин В	Coriobacteriaceae	0,326	0,014
Тестостерон	Burkholderiaceae_A	0,328	0,001
Тестостерон	Actinomycetaceae	0,404	<0,001
Тестостерон	Streptomycetaceae	0,368	0,024
Шкала нарушений сперматогенеза	Burkholderiaceae_A	0,309	0,008
Шкала нарушений сперматогенеза	Pseudomonadaceae	0,289	0,006
Шкала нарушений сперматогенеза	Acutalibacteraceae	0,259	0,019
Шкала нарушений сперматогенеза	Pasteurellaceae	0,297	0,034
Шкала нарушений сперматогенеза	Dermabacteraceae	0,293	0,027
Шкала нарушений сперматогенеза	Marinococcaceae	0,232	0,036
Шкала нарушений сперматогенеза	Coprobacillaceae	0,266	0,022
Шкала нарушений сперматогенеза	Haliangiaceae	0,254	0,013
Шкала нарушений сперматогенеза	Caulobacteraceae	0,244	0,047

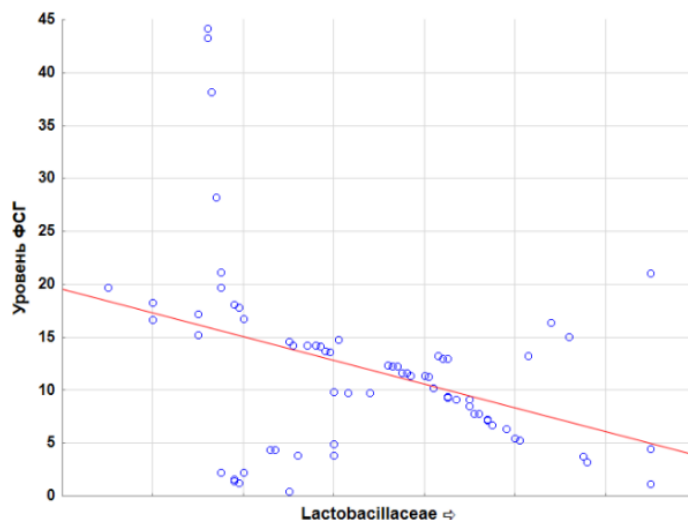


Рисунок 5.11 – Взаимосвязь уровня ФСГ с численностью *Lactobacillaceae*

Аналогичным образом, уровень ЛГ показал статистически значимую отрицательную корреляцию с общим числом ASV (amplicon sequence variants) ($R = -0,312$; $p = 0,006$), а также с относительным содержанием *Lactobacillaceae* ($R = -0,320$; $p = 0,017$), *Moraxellaceae* ($R = -0,393$; $p < 0,001$), *Porphyromonadaceae* ($R = -0,303$; $p = 0,004$), *Flavobacteriaceae* ($R = -0,400$; $p = 0,001$) (Рисунок 5.12), *Dermatophilaceae* ($R = -0,344$; $p = 0,030$), *Sphingobacteriaceae* ($R = -0,342$; $p = 0,024$) и *Salinicoccaceae* ($R = -0,304$; $p = 0,046$). Эти данные могут свидетельствовать о системном влиянии гонадотропной дисрегуляции на локальные микробные сообщества.

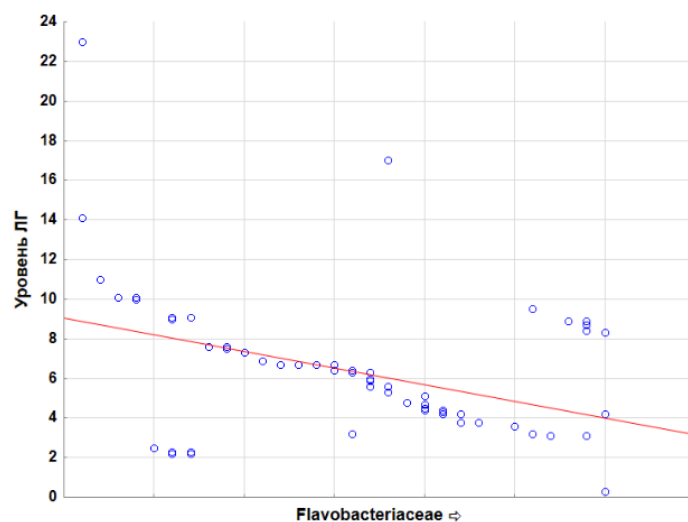


Рисунок 5.12 – Взаимосвязь уровня ЛГ с численностью *Flavobacteriaceae*

В противоположность этому, уровень ингибина В, отражающий функциональную активность клеток Сертоли, положительно коррелировал с численностью различных бактериальных таксонов: *Bacteroidaceae* ($R = 0,409$; $p = 0,028$), *Burkholderiaceae_A* ($R = 0,445$; $p < 0,001$), *Pasteurellaceae* ($R = 0,479$; $p < 0,001$) (Рисунок 5.13), *Aerococcaceae* ($R = 0,318$; $p = 0,016$), *Acutalibacteraceae* ($R = 0,375$; $p = 0,004$) и *Coriobacteriaceae* ($R = 0,326$; $p = 0,014$), что может указывать на возможную связь между сохранённой функцией поддерживающих клеток и наличием определённой тестикулярной микробиоты.

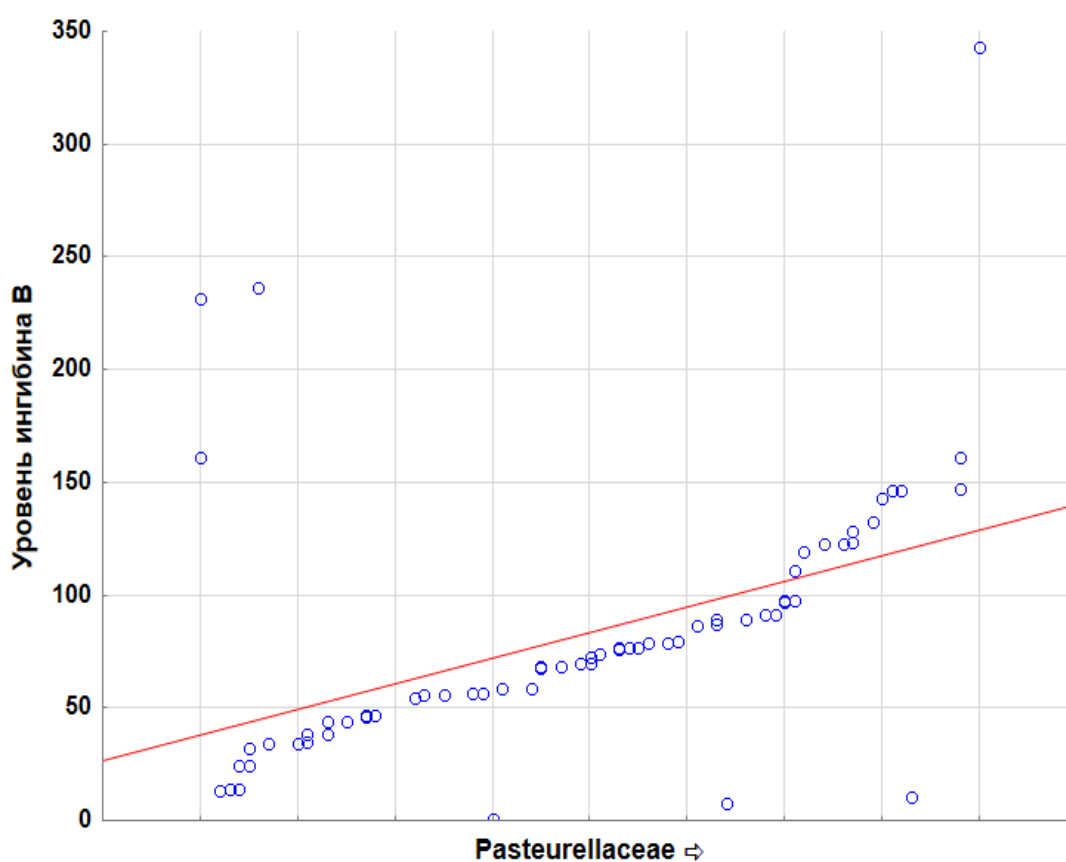


Рисунок 5.13 – Взаимосвязь уровня ингибина В с численностью Pasteurellaceae

Кроме того, уровень тестостерона положительно ассоциировался с представителями *Burkholderiaceae_A* ($R = 0,328$; $p = 0,001$), *Actinomycetaceae* ($R = 0,404$; $p < 0,001$) (Рисунок 5.14) и *Streptomycetaceae* ($R = 0,368$; $p = 0,024$), что также может отражать роль андрогенной регуляции в поддержании определенного микробного баланса.

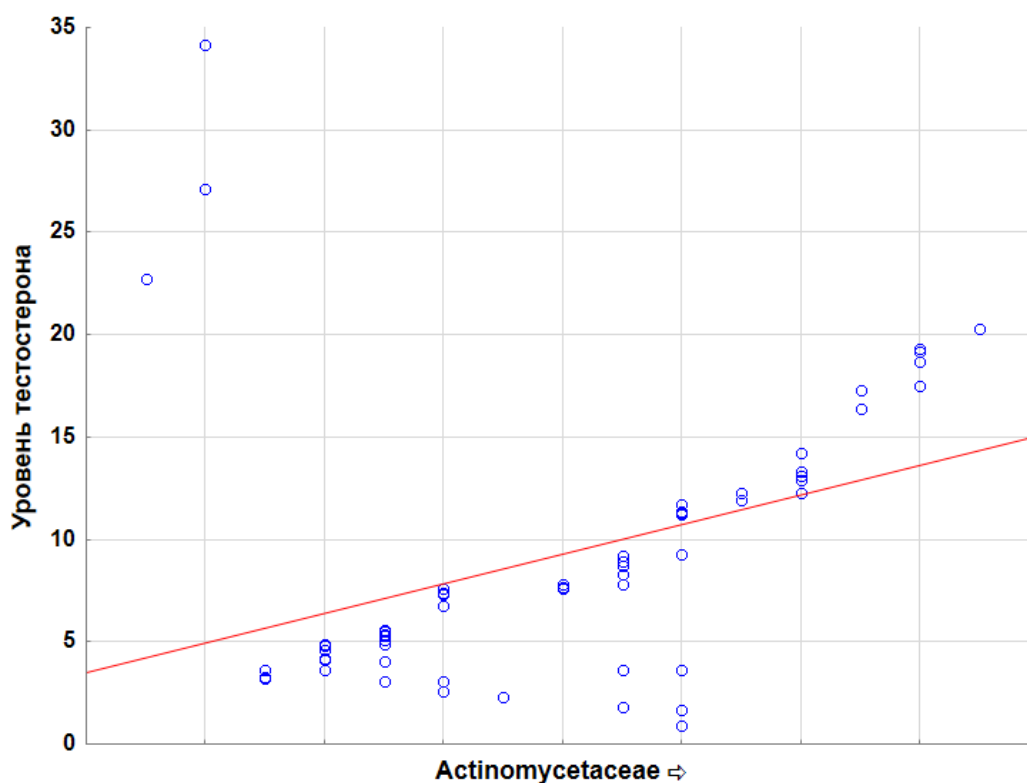


Рисунок 5.14 – Взаимосвязь уровня тестостерона с численностью Actinomycetaceae

Интересные закономерности наблюдались при оценке выраженности воспалительных изменений по шкале нарушений сперматогенеза. Относительное обилие *Burkholderiaceae_A* показало умеренную положительную корреляцию с баллами по шкале ($R = 0,309$; $p = 0,008$) (Рисунок 5.15), что позволяет предположить участие представителей данного таксона в формировании локального воспалительного ответа. Также статистически значимые положительные корреляции с уровнем воспаления были зафиксированы для *Pseudomonadaceae* ($R = 0,289$; $p = 0,006$), *Acutalibacteraceae* ($R = 0,259$; $p = 0,019$), *Pasteurellaceae* ($R = 0,297$; $p = 0,034$), *Dermabacteraceae* ($R = 0,293$; $p = 0,027$), *Marinococcaceae* ($R = 0,232$; $p = 0,036$), *Coprobacillaceae* ($R = 0,266$; $p = 0,022$), *Haliangiaceae* ($R = 0,254$; $p = 0,013$) и *Caulobacteraceae* ($R = 0,244$; $p = 0,047$), что может свидетельствовать об их роли в патогенезе хронического воспалительного процесса.

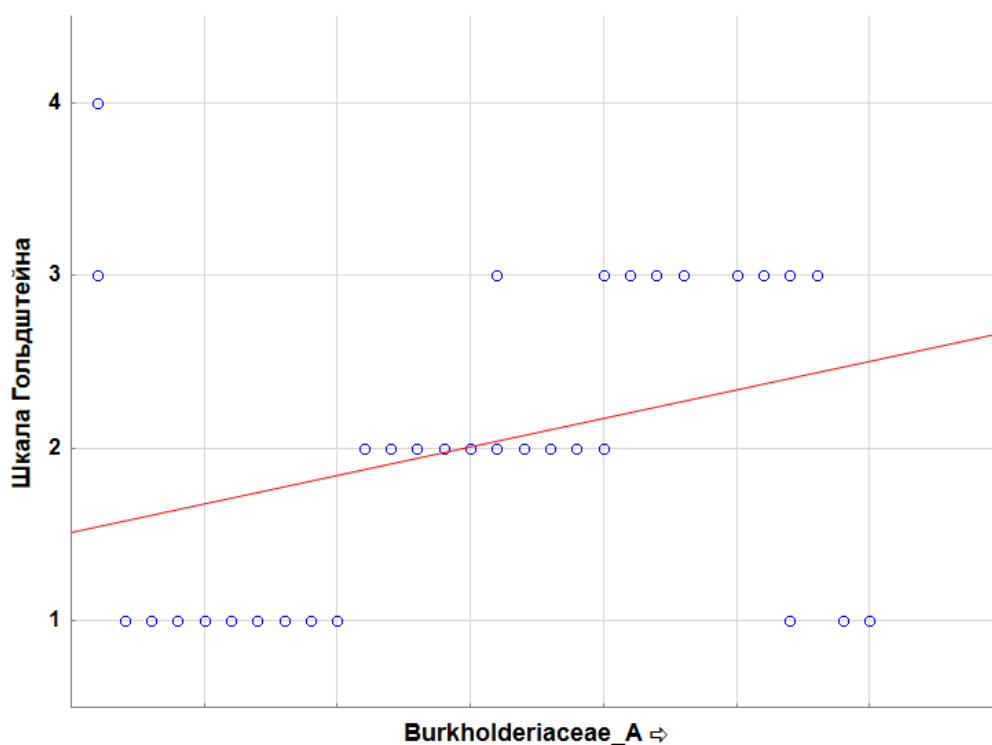


Рисунок 5.15 – Взаимосвязь показателей шкалы нарушений сперматогенеза с численностью *Burkholderiaceae_A*

Таким образом, полученные данные указывают на наличие сложных взаимосвязей между гормональным статусом, воспалительными маркерами и структурой микробных сообществ ткани яичка у пациентов с НОА, часть из которых может быть клинически значимой и требует дальнейшего изучения в рамках патогенеза нарушений сперматогенеза.

5.5 Взаимосвязь состава микробиоты ткани яичка с клинико-лабораторными показателями пациентов с обструктивной азооспермией

Корреляционный анализ, проведённый у пациентов с обструктивной формой азооспермии, выявил ряд статистически значимых ассоциаций между таксономическим составом микробиоты ткани яичка и ключевыми клинико-лабораторными показателями, отражающими гормональный статус, сперматогенную активность и наличие воспалительных изменений (Таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Значимые корреляции между микробиотой ткани яичка и клинико-лабораторными показателями у пациентов с обструктивной азооспермией

Клинический показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
ФСГ	Streptococcaceae	0,659	<0,001
ФСГ	Flumetobacteraceae	0,368	0,028
ФСГ	Rhodanobacteraceae	-0,387	0,014
ЛГ	Streptococcaceae	0,490	0,004
ЛГ	Weeksellaceae	0,424	0,048
ЛГ	Porphyromonadaceae	0,397	0,037
Ингибин В	Bacteroidaceae	0,459	0,010
Ингибин В	Acetobacteraceae	0,381	0,022
Ингибин В	Enterobacteriaceae_A	0,537	<0,001
Ингибин В	Dialisteraceae	0,489	0,031
Ингибин В	Pasteurellaceae	0,386	0,044
Ингибин В	Bacillaceae_H	0,379	0,027
Ингибин В	Marinococcaceae	0,386	0,039
Ингибин В	Oscillospiraceae	0,563	<0,001
Ингибин В	Coprobacillaceae	0,430	0,002
Ингибин В	Beijerinckiaceae	0,417	0,037
Ингибин В	Peptostreptococcaceae	0,372	0,049
Ингибин В	c__Polyangia;.o__DRWM01;f__JAAZOP01	0,381	0,012
Ингибин В	Coriobacteriaceae	0,479	0,024
Ингибин В	Listeriaceae	0,433	0,008
Ингибин В	c__Alphaproteobacteria; __; __	0,379	0,038
Ингибин В	Xanthobacteraceae	0,528	0,019
Ингибин В	o__Vicinamibacterales; f__UBA2999	0,501	0,009
Ингибин В	o__Burkholderiales; f__SG8-39	0,463	0,015
Ингибин В	Rhodanobacteraceae	0,458	0,043
Ингибин В	o__Bacillales_B;f__DSM-18226	0,366	0,046
Ингибин В	Streptosporangiaceae	0,376	0,038
Тестостерон	Bacteroidaceae	0,388	0,014
Тестостерон	Dermabacteraceae	-0,441	0,012
Тестостерон	Pelagibacteraceae	-0,390	0,040
Шкала нарушений сперматогенеза	Burkholderiaceae_A	-0,379	<0,001
Шкала нарушений сперматогенеза	Aerococcaceae	0,379	0,017

Продолжение таблицы 5.5

Клинический показатель	Таксон / Показатель микробиоты	R	p
Шкала нарушений сперматогенеза	Veillonellaceae	-0,361	0,009
Шкала нарушений сперматогенеза	Obscuribacteraceae	-0,390	0,023
Шкала нарушений сперматогенеза	Chitinophagaceae	-0,408	0,002
Шкала нарушений сперматогенеза	c__Polyangia;o__DRWM01;f__JAAZOP01	-0,437	0,012
Шкала нарушений сперматогенеза	Haliangiaceae	-0,431	0,009

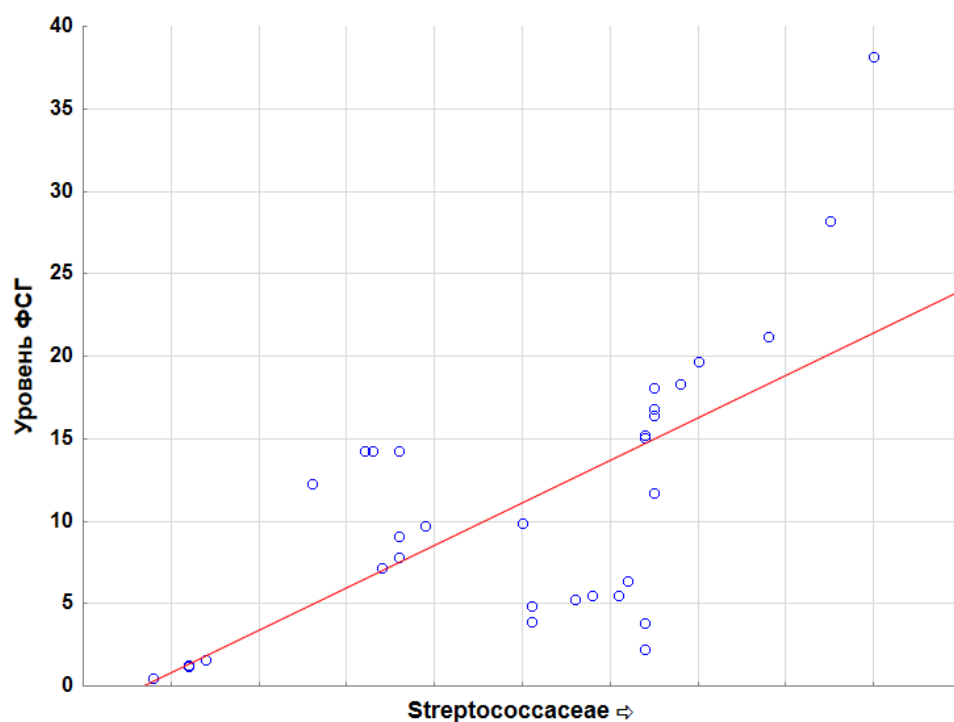


Рисунок 5.16 – Взаимосвязь уровня ФСГ с численностью Streptococcaceae

Поскольку при ОА уровни гонадотропинов обычно не повышены, такие ассоциации могут отражать особенности местной микробной среды, потенциально вовлечённой в регуляцию иммунных процессов в условиях обструкции. ЛГ также положительно коррелировал с численностью

Streptococcaceae ($R = 0,490$; $p = 0,004$) (Рисунок 5.17), а также с таксонами *Weeksellaceae* ($R = 0,424$; $p = 0,048$) и *Porphyromonadaceae* ($R = 0,397$; $p = 0,037$), что может указывать на опосредованное влияние андрогенной оси на состав локальной микробиоты или, наоборот, на иммуномодулирующее действие указанных микробных групп, ассоциированных с продукцией гонадотропинов.

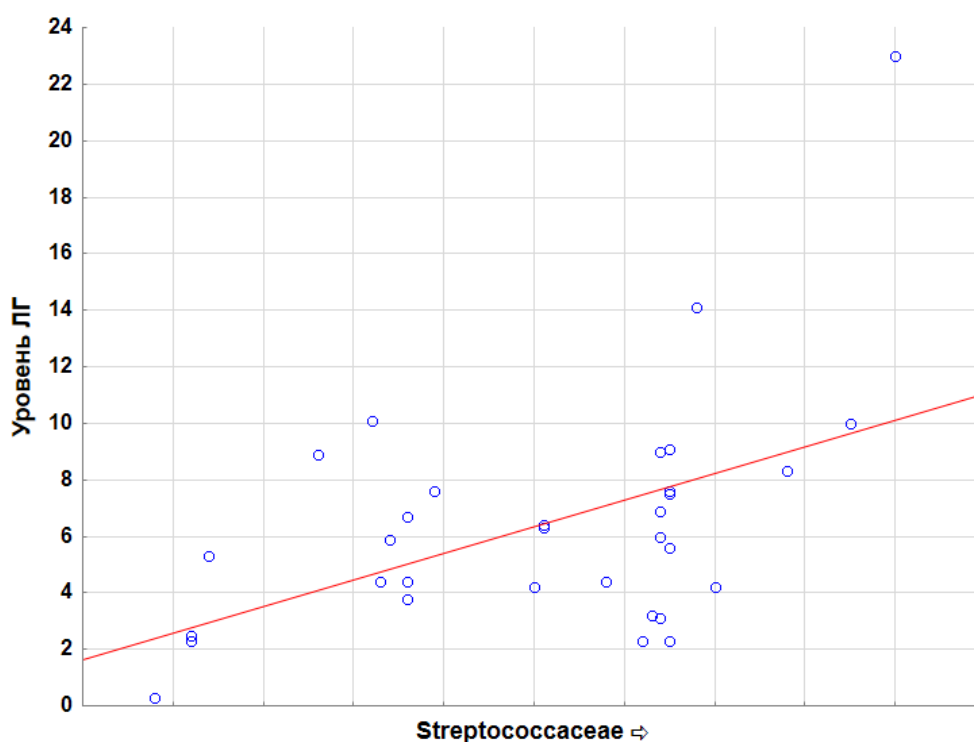


Рисунок 5.17 – Взаимосвязь уровня ЛГ с численностью *Streptococcaceae*

Особый интерес представляют корреляции между микробиотой и уровнем ингибина В – биомаркера функциональной активности клеток Сертоли и, косвенно, сохранённого сперматогенеза. Уровень ингибина В показал многочисленные положительные корреляции с различными бактериальными таксонами, включая *Bacteroidaceae* ($R = 0,459$; $p = 0,010$), *Acetobacteraceae* ($R = 0,381$; $p = 0,022$), *Enterobacteriaceae_A* ($R = 0,537$; $p < 0,001$), *Dialisteraceae* ($R = 0,489$; $p = 0,031$), *Pasteurellaceae* ($R = 0,386$; $p = 0,044$), *Bacillaceae_H* ($R = 0,379$; $p = 0,027$), *Marinococcaceae* ($R = 0,386$; $p = 0,039$), *Oscillospiraceae* ($R = 0,563$; $p < 0,001$) (Рисунок 5.18), *Coprobaclillaceae* ($R = 0,430$; $p = 0,002$), *Beijerinckiaceae* ($R =$

0,417; $p = 0,037$), *Peptostreptococcaceae* ($R = 0,372$; $p = 0,049$), *Coriobacteriaceae* ($R = 0,479$; $p = 0,024$), *Listeriaceae* ($R = 0,433$; $p = 0,008$), *Xanthobacteraceae* ($R = 0,528$; $p = 0,019$), а также с рядом таксонов, обозначенных на более высоком таксономическом уровне (например, *o__Vicinamibacterales*; *f__UBA2999* — $R = 0,501$; $p = 0,009$, *o__Burkholderiales*; *f__SG8-39* — $R = 0,463$; $p = 0,015$, *o__Bacillales_B*; *f__DSM-18226* — $R = 0,366$; $p = 0,046$, *c__Polyangia*; *o__DRWM01*; *f__JAAZOP01* — $R = 0,381$; $p = 0,012$). Эти данные могут отражать формирование благоприятной микробной среды на фоне сохранённой функции клеток Сертоли и поддержания локального гомеостаза.

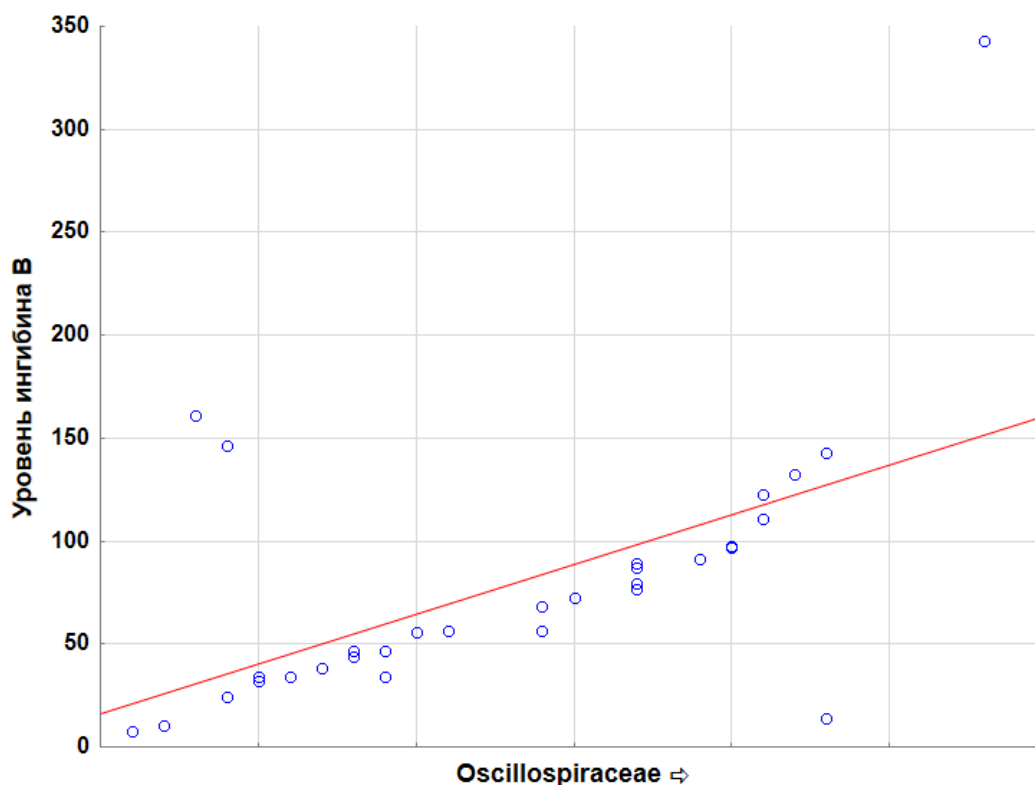


Рисунок 5.18 – Взаимосвязь уровня ингибина В с численностью Oscillospiraceae

Уровень тестостерона продемонстрировал разноправленные корреляции: положительную с *Bacteroidaceae* ($R = 0,388$; $p = 0,014$) и отрицательные с *Dermaabacteraceae* ($R = -0,441$; $p = 0,012$) (Рисунок 5.19) и *Pelagibacteraceae* ($R = -0,390$; $p = 0,040$). Последние могут быть интерпретированы как отражение

микробного дисбаланса при снижении андрогенной стимуляции, что требует дополнительного изучения.

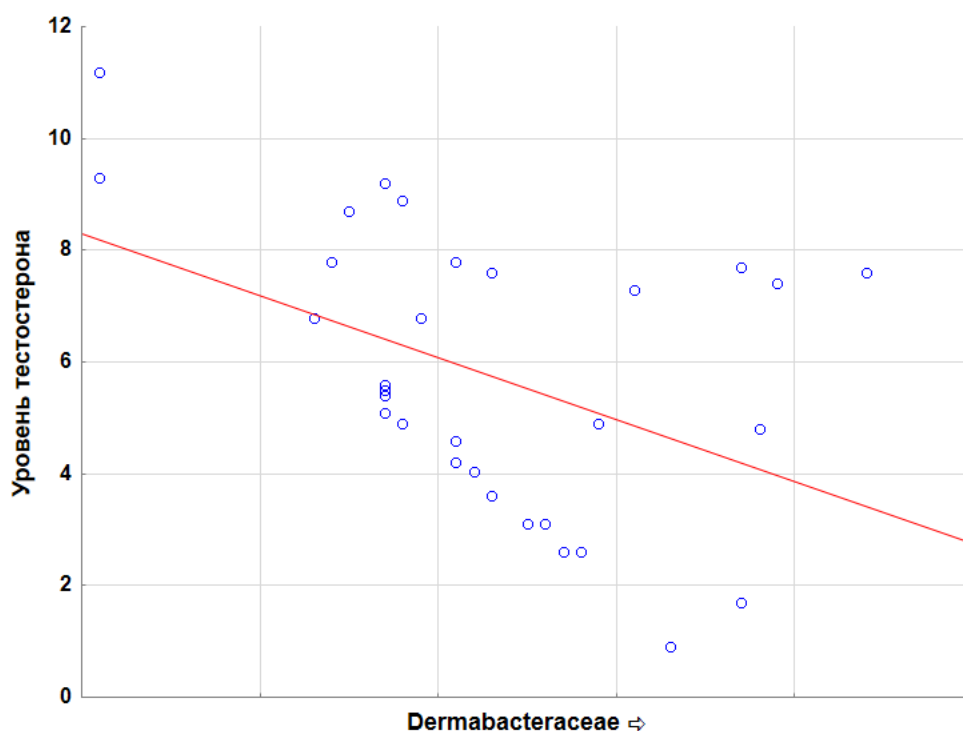


Рисунок 5.19 – Взаимосвязь уровня тестостерона с численностью Dermabacteraceae

Анализ взаимосвязи с выраженностью воспалительных изменений по шкале нарушений сперматогенеза также показал ряд значимых корреляций. В частности, были выявлены отрицательные связи с численностью *Burkholderiaceae_A* ($R = -0,379$; $p < 0,001$), *Veillonellaceae* ($R = -0,361$; $p = 0,009$), *Obscuribacteraceae* ($R = -0,390$; $p = 0,023$), *Chitinophagaceae* ($R = -0,408$; $p = 0,002$), *Haliangiaceae* ($R = -0,431$; $p = 0,009$) и таксона *c__Polyangia; o__DRWM01; f__JAAZOP01* ($R = -0,437$; $p = 0,012$) (Рисунок 5.20). Эти корреляции могут указывать на потенциальное снижение численности микробных групп с предполагаемой противовоспалительной активностью на фоне формирования воспалительного процесса в тестикулярной ткани при обструктивной азооспермии.

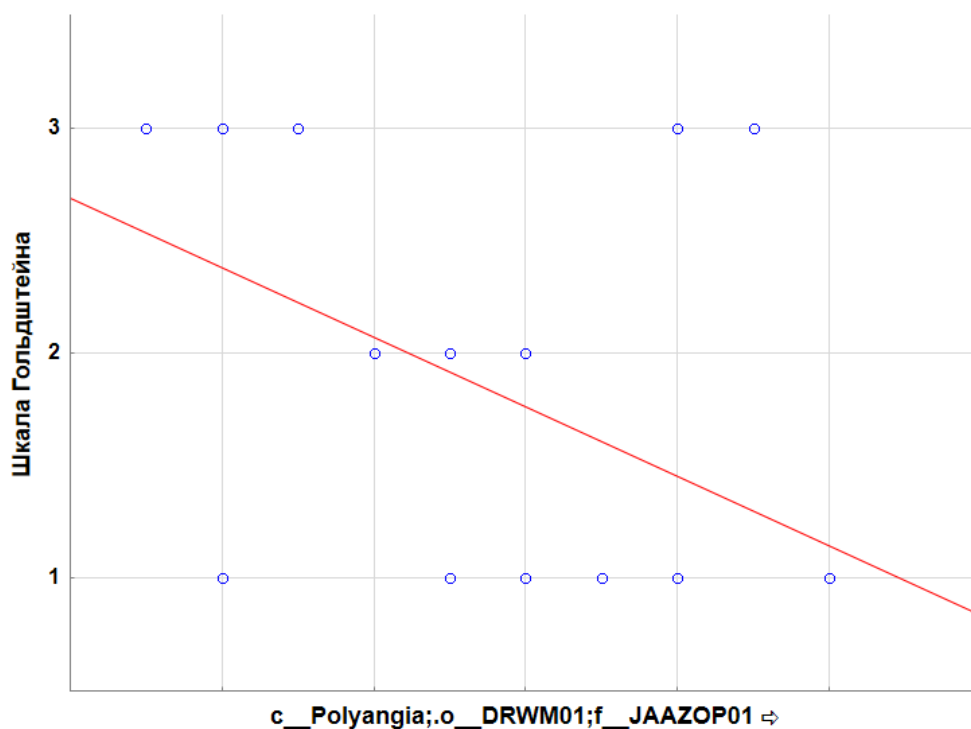


Рисунок 5.20 – Взаимосвязь показателей шкалы нарушений сперматогенеза с численностью c_Polyangia; o_DRWM01; f_JAAZOP01

Таким образом, микробиота ткани яичка при ОА демонстрирует множество значимых ассоциаций с гормональными и воспалительными параметрами. В отличие от необструктивной формы, здесь наблюдается преобладание положительных корреляций между микробными таксонами и уровнем ингибина В, что может указывать на различную структуру микробных паттернов в зависимости от патогенетического варианта азооспермии. Эти данные подчёркивают важность учёта микробного компонента в комплексной оценке мужского бесплодия.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВАНИИ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБИОТЫ ЯИЧКА И УРЕТРЫ ПАЦИЕНТОВ С АЗОСПЕРМИЕЙ

В рамках настоящего исследования были проанализированы микробиологические параметры у пациентов с различными формами азооспермии, с учётом исходов применения ВРТ.

Всего исследовано 208 образцов, полученных от 104 пациентов. От каждого пациента было получено два типа образцов – биоптаты ткани яичка и мазки из уретры. Пациенты были стратифицированы по двум основным диагностическим категориям – НОА и ОА – с последующим разделением по результатам ВРТ.

У 72 пациентов диагностирована НОА, из которых у 56 был получен отрицательный результат (группа 1А), у 16 был получен положительный результат ВРТ (наличие беременности у партнёрши) (группа 1Б). В группу с ОА вошли 32 пациента: у 19 из них ВРТ завершилось отсутствием результата (группа 2А), у 13 был получен положительный результат (группа 2Б).

Использованный дизайн исследования позволил обеспечить прямое сопоставление локального микробного профиля уретры и ткани яичка с клиническими исходами ВРТ, что создаёт предпосылки для выявления микробиомных маркеров прогноза эффективности лечения.

6.1 Уровни гормонов и показателей шкалы нарушений сперматогенеза у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

Оценка уровня ФСГ показала, что в группе 1А (НОА, ВРТ-) значение данного показателя составило $7,0 \pm 0,7$ Ед/л, в группе 1Б (НОА, ВРТ+) было несколько ниже – $5,5 \pm 1,0$ Ед/л. Максимальной была величина концентрации ФСГ у пациентов с ОА и отрицательным результатом применения ВРТ – $17,0 \pm$

2,18 Ед/л, значение показателя было статистически значимо выше ($p < 0,05$) двух вышеуказанных уровней, а также значения в группе 2Б (ОА, ВРТ+) – $9,2 \pm 1,2$ Ед/л (Рисунок 6.1).

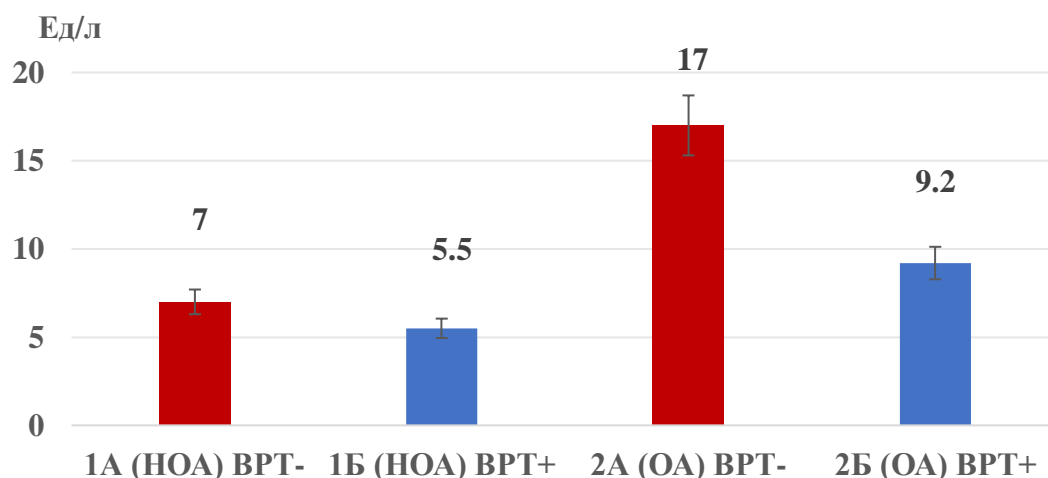


Рисунок 6.1 – Концентрации фолликулостимулирующего гормона у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

Анализ уровней ЛГ показал, что в группах пациентов с НОА концентрации этого гормона были минимальными: $4,2 \pm 1,0$ и $5,2 \pm 1,2$ Ед/л, соответственно, при отрицательном и положительном результатах применения ВРТ (Рисунок 6.2).

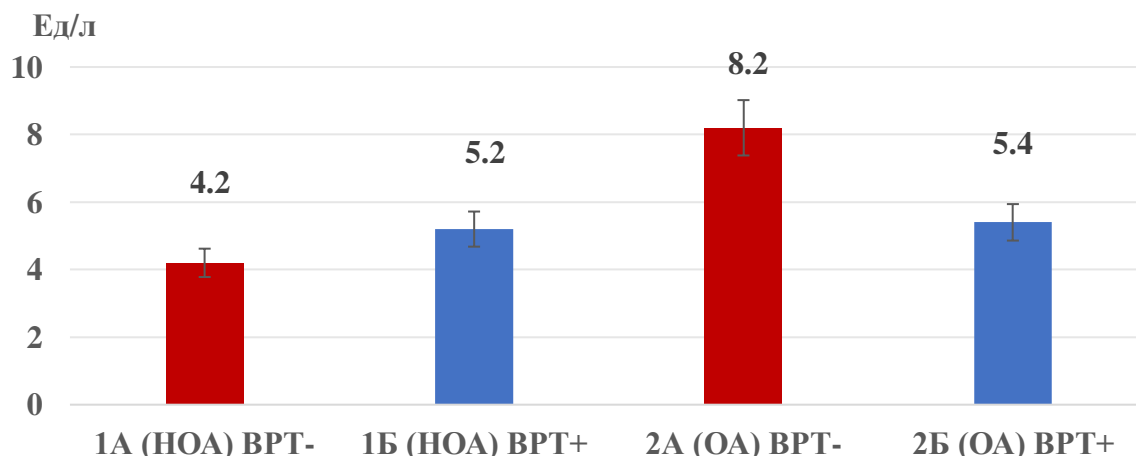


Рисунок 6.2 – Концентрации лютеинизирующего гормона у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

Максимальной была концентрация ЛГ в группе 2А (ОА, ВРТ-) – $8,2 \pm 1,6$ Ед/л, значение показателя было достоверно выше таковых в остальных группах, в том числе в группе 2Б (ОА, ВРТ+) – $5,4 \pm 0,5$ Ед/л.

Сравнение уровней ингибина В показало, что в группах с положительным результатом применения ВРТ величина данного параметра была статистически значимо выше ($p < 0,05$), чем в группах с отрицательным результатом ВРТ (Рисунок 6.3).

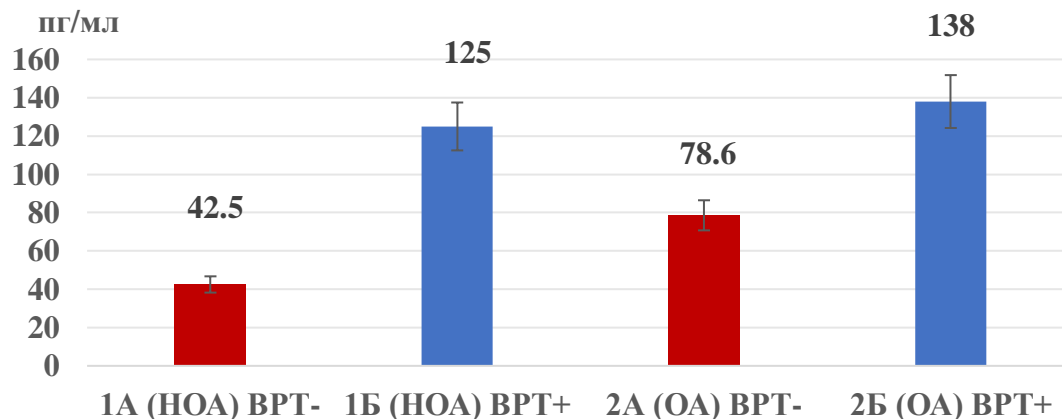


Рисунок 6.3 – Концентрации ингибина В у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

Оценка уровня тестостерона показала, что в группе 1А (НОА, ВРТ-) его значение было минимальным – $3,9 \pm 0,6$ нмоль/л, в группе 1Б (НОА, ВРТ+) концентрация этого гормона была статистически значимо выше ($p < 0,05$) – $7,1 \pm 1,1$ нмоль/л. В группах пациентов с ОА величина данного показателя была достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группе 1А, составив в группе 2А (ОА, ВРТ-) $9,4 \pm 1,9$ нмоль/л, в группа 2Б (ОА, ВРТ+) – $10,2 \pm 1,7$ нмоль/л (Рисунок 6.4).

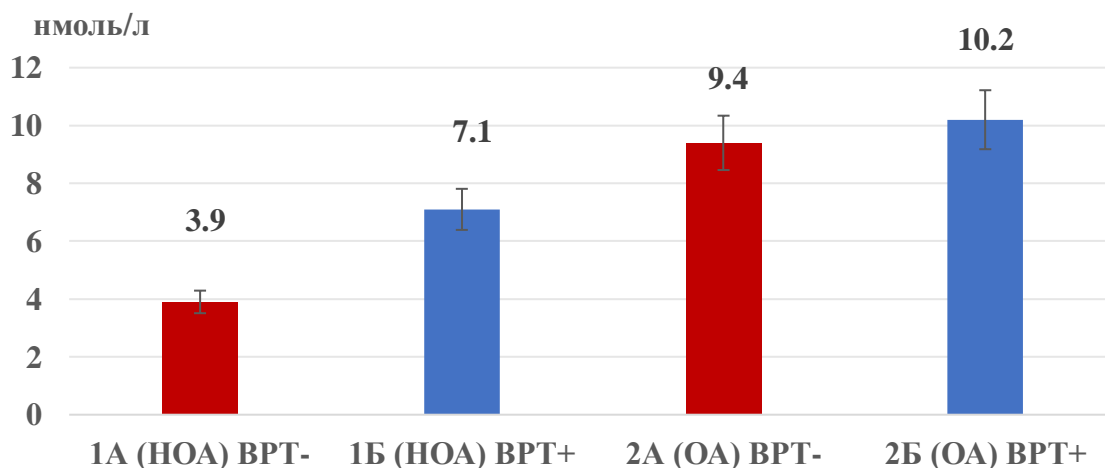


Рисунок 6.4 – Концентрации тестостерона у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

Сопоставление уровней оценки нарушений сперматогенеза показало, что в группе 1А (НОА, ВРТ-) было минимальным – $2,3 \pm 1,0$, в группах 1Б (НОА, ВРТ+) и 2А (ОА, ВРТ-) величина показателя данной шкалы была достоверно выше ($p < 0,05$), соответственно $3,8 \pm 0,2$, в группе 1Б (НОА, ВРТ+) несколько ниже – $3,4 \pm 0,3$ (Рисунок 6.5).

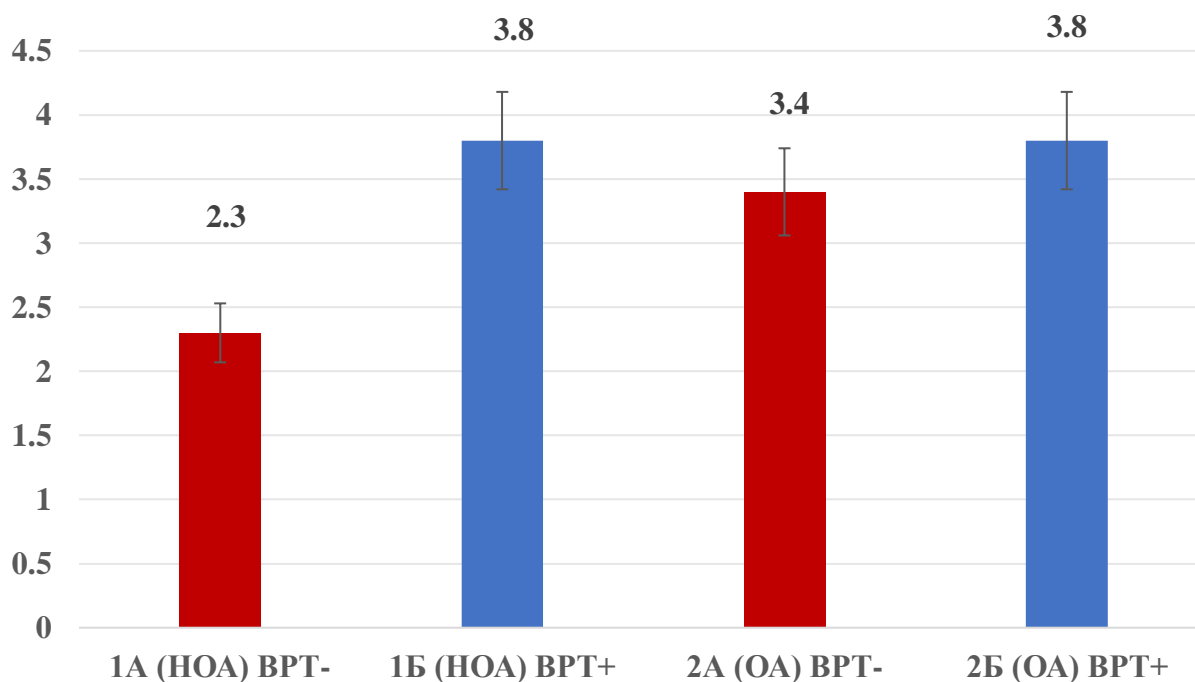


Рисунок 6.5 – Уровни оценки по шкале нарушений сперматогенеза у пациентов с различными формами азооспермии и результатами применения ВРТ

6.2 Таксономический состав микробиоты ткани яичка у пациентов с различными формами азооспермии

Анализ таксономической структуры микробиоты биоптатов ткани яичка выявил различия в распределении доминирующих фил. в зависимости от формы азооспермии и результата применения ВРТ (Таблица 6.1). Наиболее широко представленной филлой во всех исследуемых группах оказалась *Proteobacteria*, с максимальной относительной представленностью у пациентов с НОА и отрицательным результатом ВРТ (34,9%).

Таблица 6.1 – Таксономический состав микробиоты яичка (относительная представленность фил) у пациентов с различными видами азооспермии в зависимости от результата ВРТ, %

Фила	Группа 1А (НОА, ВРТ-) n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+) n=16	Группа 2А (ОА, ВРТ-) n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+) n=13
Proteobacteria	34,9	33,2	23,6	18,1
Firmicutes_D	9,3	6,3	8,9	9,3
Actinobacteriota	6,2	7,6	6,9	9,2
Firmicutes_A	4,2	5,1	5,8	2,9
Bacteroidota	3,8	5,2	3,3	5,9
Other	41,6	42,6	51,5	54,9

Полученные результаты могут свидетельствовать о потенциальной связи избыточного присутствия Proteobacteria с неблагоприятными исходами ВРТ и выраженными нарушениями сперматогенеза при НОА, отражать участие представителей Bacteroidota в модуляции иммунной среды яичка или влиянии на метаболическую активность клеток Сертоли и Лейдига, свидетельствовать о более высоком микробном разнообразии в условиях анатомической обструкции и сохранности барьеров между микробной и сперматогенной нишами.

Анализ микробного профиля ткани яичка у пациентов с ОА и НОА продемонстрировал вариабельность относительной представленности ключевых бактериальных семейств в зависимости от формы азооспермии и клинического исхода ВРТ (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Таксономический состав микробиоты яичка (относительная представленность семейств) у пациентов с различными видами азооспермии в зависимости от результата ВРТ, %

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-) n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+) n=16	Группа 2А (ОА, ВРТ-) n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+) n=13
Enterobacteriaceae_A	17,6	6,7	5,3	7,6
Burkholderiaceae_A_580492	9,3	16,9	4,3	7,9
Acetobacteraceae	3,7	1,6	0,6	1,0
Mycobacteriaceae	2,8	2,3	3,1	5,4
Peptoniphilaceae	2,0	2,0	1,6	2,5

Продолжение таблицы 6.2

Staphylococcaceae	1,8	2,2	3,2	1,4
Bacteroidaceae	1,4	1,9	3,1	0,4
Lactobacillaceae	1,3	2,4	1,4	1,0
Lachnospiraceae	0,9	2,4	1,8	0,6
Obscuribacteraceae	0,9	0,7	2,7	4,3
Streptococcaceae	0,7	1,7	2,3	1,5
Chitinophagaceae_966727	0,3	0,3	2,1	1,1
Other	57,1	58,8	68,5	65,3

Установлено, что доминирующими таксонами во всех исследуемых группах являются представители семейства *Enterobacteriaceae_A* и *Burkholderiaceae_A_580492*, что указывает на их значительную роль в микробной экосистеме.

Наибольшая представленность *Enterobacteriaceae_A* наблюдается в группе с НОА и негативным результатом ВРТ, что может указывать на их ассоциацию с неблагоприятными микробиологическими условиями, способствующими снижению успеха процедур ВРТ. В то же время, в группе НОА с положительным исходом ВРТ наблюдается значительное снижение доли этого семейства, что может свидетельствовать о благоприятном влиянии нормализации микробной популяции на репродуктивные результаты.

Семейство *Burkholderiaceae_A_580492* демонстрирует обратную зависимость: его доля возрастает в группе НОА с успешным исходом ВРТ, предполагая, что подобные таксоны могут играть протективную роль в контексте репродуктивного здоровья. Также отмечено, что представители *Mycobacteriaceae* увеличивают свою долю в группах с успешным результатом ВРТ, что может быть связано с их функциями в поддержании тканевого гомеостаза и регуляции иммунного ответа.

Другие интересные результаты касаются семейств *Bacteroidaceae* и *Obscuribacteraceae*, которые показали динамику представительности в зависимости от успешности ВРТ, что может указывать на их потенциальную роль в воспалительных процессах, влияющих на имплантацию эмбриона.

Некоторые семейства, такие как *Lachnospiraceae* и *Lactobacillaceae*, имели

повышенные показатели в группах с положительным исходом ВРТ, предлагая их участие в поддержании микробной равновесия и барьерной защиты. В группе ОА отмечается наибольшая таксономическая вариабельность, что может быть связано с анатомическими и физиологическими особенностями.

Таким образом, результаты подчеркивают значимость микробиоты яичка в контексте репродуктивного здоровья и эффективности ВРТ, открывая новые горизонты для дальнейшего изучения её роли в мужской фертильности.

6.3 Таксономический состав микробиоты уретры на уровне фил у пациентов с азооспермией

Анализ таксономического профиля микробиоты уретры показал различия в относительной представленности бактериальных фил в зависимости от формы азооспермии (обструктивная или необструктивная) и исхода применения ВРТ (Таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Таксономический состав микробиоты уретры (относительная представленность фил) у пациентов с различными видами азооспермии в зависимости от результата ВРТ, %

Фила	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13
Firmicutes_D	21,6	14,9	19,5	24,7
Firmicutes_A	18,4	12,2	17,4	18,2
Actinobacteriota	15,5	5,9	21,4	7,2
Proteobacteria	13,1	7,5	9,7	4,9
Bacteroidota	9,2	14,9	6,1	8,8
Firmicutes_C	3,8	4,1	3,5	3,8
Other	18,4	40,4	22,4	32,4

Основное внимание уделяется филам Firmicutes, Actinobacteriota, Proteobacteria и Bacteroidota, которые демонстрируют заметные различия между группами.

Фила Firmicutes, включая подгруппы Firmicutes_D, Firmicutes_A и Firmicutes_C, представлена достаточно высокими значениями во всех группах, при этом наиболее выраженная доля отмечена у пациентов с ОА и успешным исходом ВРТ. Снижение доли Firmicutes при положительном результате ВРТ у пациентов с НОА может свидетельствовать о смещении микробного баланса.

Отличия в представленности Actinobacteriota указывают на возможную корреляцию с менее благоприятным микробным состоянием, особенно у пациентов с НОА. Снижение доли Proteobacteria при положительном исходе ВРТ также может указывать на восстановление микробного равновесия, что важно для снижения бактериальной нагрузки и воспалительных процессов.

В то же время повышение доли Bacteroidota при положительном результате ВРТ у мужчин с НОА может говорить о их потенциальной положительной роли в нормализации микробной среды. Наконец, категория "Other" с возрастанием доли у пациентов с положительным исходом ВРТ может отражать высокую вариабельность микробиоты или вытеснение доминирующих таксонов менее распространёнными бактериями, которые могут выполнять защитные функции.

Таким образом, результаты таблицы подчеркивают важность детального изучения микробного состава уретры в контексте фертильности и успешности репродуктивных технологий.

Таксономический анализ микробиоты уретры на уровне бактериальных семейств выявил существенные различия в микробном профиле между группами пациентов с ОА и НОА, а также в зависимости от результата ВРТ (Таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Таксономический состав микробиоты уретры (относительная представленность семейств) у пациентов с различными видами азооспермии в зависимости от результата ВРТ, %

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13
Mycobacteriaceae	19,6	4,8	31,1	12,2
Staphylococcaceae	7,9	15,7	5,8	12,6

Продолжение таблицы 6.4

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13
Lactobacillaceae	7,7	1,7	0,9	3,7
Peptoniphilaceae	7,4	5,9	10,9	6,5
Bacillaceae_H	5,6	1,1	3,0	0,007
Lachnospiraceae	4,7	13,9	7,4	7,6
Weeksellaceae	4,7	8,5	0,08	2,7
Bacteroidaceae	2,5	0,2	3,4	0,5
Streptococcaceae	2,2	1,0	0,001	1,6
Micrococcaceae	1,4	3,8	6,5	3,1
Moraxellaceae	1,2	2,0	1,7	1,8
Bifidobacteriaceae	1,1	3,4	1,3	2,4
Enterobacteriaceae_A	0,91	0,26	1,2	2,3
Neisseriaceae	0,78	2,85	0,04	1,2
Beijerinckiaceae	0,08	0,41	0,12	6,30
Other	32,1	34,5	26,6	35,4

Полученные данные демонстрируют как наличие доминирующих семейств с устойчивым присутствием во всех группах, так и появление потенциально прогностически значимых таксонов, варибельность которых может быть связана с исходом ВРТ. Например, семейство *Mycobacteriaceae* имеет высокую представленность у пациентов с обструктивной азооспермией и отрицательным исходом ВРТ, что может сигнализировать о наличии воспалительных процессов, негативно влияющих на результативность вмешательства. Напротив, увеличение доли семейства *Staphylococcaceae* в группах с положительным результатом может указывать на их роль в поддержании стабильного микробного баланса.

Кроме того, высшая представленность семейства *Lachnospiraceae* в группе с нормальной азооспермией и положительным результатом может свидетельствовать о их вовлеченности в иммунорегуляцию и восстановление гомеостаза, в то время как семейства *Bacteroidaceae* и *Bacillaceae_H* продемонстрировали снижение в группах с успешным ВРТ, что может отражать положительные изменения в микробном состоянии.

Также значительное увеличение семейства Veijerinckiaseae у пациентов с ОА и положительным результатом ВРТ может указывать на их роль в микробной перестройке, способствующей успеху лечения. Наконец, категория "Другие" показывает высокий уровень таксономического разнообразия в группах с успешным исходом, что может служить показателем улучшения состояния микробиоты. Таким образом, результаты демонстрируют сложные взаимосвязи между микробиотой уретры и клиническими исходами в контексте азооспермии и терапии ВРТ.

6.4 Сравнительный анализ индексов альфа-разнообразия микробиоты уретры и ткани яичка

Оценка альфа-разнообразия микробиоты ткани яичка и уретры у пациентов ОА и НОА не выявила статистически достоверных различий между группами с положительным и отрицательным результатом применения ВРТ (Таблица 6.5). Тем не менее, ряд наблюдаемых тенденций заслуживает внимания с точки зрения возможных биологических интерпретаций.

Таблица 6.5 - Индексы альфа-разнообразия в исследуемых образцах ($M \pm m$)

Биологический образец	Группы	Результат ВРТ	Кол-во ASV	Филогенетическое разнообразие	Индекс Симпсона	Индекс Шеннона
Ткань яичка	Группа 1А (НОА)	-	109,5±97,5	54,2±69,5	0,81±0,13	3,8±1,5
		+	120,4±80,3	55,7±56,3	0,84±0,14	4,4±1,4
	Группа 2 (ОА)	-	126,3±106,9	40,4±60,4	0,88±0,11	4,7±1,7
		+	73,0±60,3	42,0±44,4	0,86±0,10	4,1±1,2
		-	102,3±105,2	61,3±92,7	0,82±0,16	4,0±1,6
		+	47,4±27,0	12,0±10,7	0,75±0,25	3,3±1,3
		-	175,0±251,1	114,9±173,8	0,81±0,14	3,9±1,9
		+	44,5±20,2	13,9±10,1	0,83±0,14	3,6±1,1

В микробиоте ткани яичка значения количества ASV и индексов Шеннона и Симпсона были сопоставимы между группами НОА/ВРТ- и НОА/ВРТ+, не демонстрируя достоверных различий.

Несмотря на отсутствие статистической значимости, наблюдалась тенденция к большей микробной насыщенности и разнообразию у пациентов с успешным исходом ВРТ, что может косвенно свидетельствовать о более сбалансированном микробиоме при сохранённой клеточной и иммунной архитектуре ткани яичка. Интересной является обратная картина при ОА, что может отражать специфические особенности микробиоты в условиях механической обструкции: возможно, менее насыщенное, но более специализированное микробное сообщество может быть более адаптивным к локальным условиям и способствовать более успешному оплодотворению.

В образцах, полученных из уретры, также не было выявлено достоверных различий между группами ВРТ+ и ВРТ-, однако выраженность изменений альфа-разнообразия была более отчётливой, особенно при НОА.

Эти данные подтверждают, что избыточное микробное разнообразие в уретре может не всегда быть благоприятным, особенно в условиях механической обструкции, где снижение микробной нагрузки может уменьшать риск вторичного воспаления или микробной транслокации.

Таким образом, несмотря на отсутствие статистически значимых различий между группами по показателям альфа-разнообразия, наблюдаемые тенденции к снижению микробного богатства и филогенетической сложности при положительном исходе ВРТ, особенно в уретральной нише, позволяют предположить, что нормализация микробного состава и устранение избыточной таксономической перегрузки может быть благоприятным фактором для наступления беременности. Эти выводы требуют подтверждения в будущих исследованиях с большей выборкой и дополнительными методами стратификации пациентов.

6.5 Сравнение таксономического состава микробиоты ткани яичка и уретры на уровне семейств у пациентов с НОА в зависимости от результатов применения ВРТ

Таксономический анализ микробиоты ткани яичка у пациентов с НОА выявил статистически значимые различия в представленности бактериальных семейств между группами с положительным и отрицательным результатом применения ВРТ. В частности, у пациентов с успешным исходом ВРТ наблюдалось достоверное увеличение относительной представленности 11 бактериальных семейств. Эти изменения затрагивали как условно-комменсальные таксоны, так и представителей с предполагаемыми метаболически активными или иммуномодулирующими функциями (Таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Бактериальные семейства, относительная представленность которых статистически значимо различается в микробиоте ткани яичка у пациентов с НОА в зависимости от результатов ВРТ, $M \pm m$

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	p
Acutalibacteraceae	0,120±0,039	0,469±0,177	<0,001
Pasteurellaceae	0,155±0,094	0,229±0,087	0,004
Coprobacillaceae	0,015±0,006	0,155±0,062	0,006
Ruminococcaceae	0,144±0,048	0,653±0,286	0,022
Trueperaceae	0,024±0,024	0,102±0,071	0,027
Cellvibrionaceae	0,005±0,004	0,665±0,582	0,030
Eggerthellaceae	0,0002±0,0002	0,055±0,051	0,036
Alcanivoracaceae	0,104±0,046	0,284±0,133	0,038
Porphyromonadaceae	0,193±0,105	0,333±0,162	0,044
Coriobacteriaceae	0,064±0,024	0,171±0,081	0,046
Lachnospiraceae	0,934±0,198	2,400±0,799	0,049

Наиболее выраженные различия касались семейств *Acutalibacteraceae*, *Cellvibrionaceae*, *Coprobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Trueperaceae* и *Eggerthellaceae*.

Представленность этих семейств была почти в три раза выше при положительном результате ВРТ, что подтверждает гипотезу об их возможной роли в обеспечении локального микробно-гормонального баланса.

Анализ микробиоты уретры также выявил значимые изменения между группами сравнения (Таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Бактериальные семейства, относительная представленность которых в микробиоте уретры у пациентов с НОА статистически значимо различается в зависимости от результатов ВРТ, $M \pm m$

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	p
Enterococcaceae	0,114±0,056	1,572±1,095	0,006
Brevibacteriaceae	0,006±0,004	0,326±0,282	0,013
Unassigned	2,450±0,629	0,203±0,143	0,018
Streptococcaceae	7,669±2,571	1,569±0,787	0,047
Microbacteriaceae	0,266±0,143	0,865±0,539	0,047
Rikenellaceae	0,041±0,022	0,213±0,146	0,049

При положительном исходе ВРТ достоверно снижалась относительная представленность семейства *Streptococcaceae* и неопределённых (*Unassigned*) таксонов, что может отражать снижение микробной нагрузки и восстановление таксономической специфичности уретрального сообщества. Повышение доли *Enterococcaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Microbacteriaceae* и *Rikenellaceae* в группе ВРТ+ может свидетельствовать о формировании микробного профиля, менее склонного к провоспалительным реакциям и лучше адаптированного к физиологическому состоянию.

Особенно показательной является резкая разница в представленности *Enterococcaceae* семейства, нередко считающегося условно-патогенным, но в определённых условиях способного выполнять протективную функцию. Их доля

при ВРТ+ увеличивалась более чем в 10 раз, что, возможно, отражает фенотипическую разницу штаммов или метаболическую кооперацию с другими представителями уретрального микробиома.

Снижение неопределённых (*Unassigned*) таксонов при ВРТ+ может интерпретироваться как индикатор более стабильного и хорошо сформированного микробного сообщества, тогда как их высокая представленность у пациентов с ВРТ- может свидетельствовать о микробной нестабильности, дисбиозе или присутствии недостаточно изученных микроорганизмов с потенциальной патогенностью.

Таким образом, выявленные различия в микробиоте ткани яичка и уретры у пациентов с НОА в зависимости от исхода ВРТ подчеркивают важную роль микробного сообщества в патофизиологии репродуктивной функции. Рост представительства метаболически активных и иммуномодулирующих таксонов в ткани яичка, а также формирование более сбалансированной микробиоты уретры у пациентов с успешным ВРТ, может отражать улучшение локального микробно-гормонального баланса, что способствует достижению беременности у партнёра. Эти данные открывают перспективы для использования микробиомных профилей как прогностических биомаркеров и потенциальных мишеней для микробиальной коррекции с целью повышения эффективности ВРТ.

При сравнении частоты встречаемости бактериальных семейств в микробиоте ткани яичка пациентов с НОА статистически значимо реже обнаруживаются пять семейств у пациентов с отрицательным результатом применения ВРТ (ВРТ-) по сравнению с группой ВРТ+ (Таблица 6.8).

Таблица 6.8 – Бактериальные семейства, для которых выявлены статистически значимые различия представленности в микробиоте ткани яичка пациентов с НОА в зависимости от результатов ВРТ, абс. (%)

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	p
<i>Acetivibacteraceae</i>	17 (30.4%)	12 (75.0%)	0,003

Продолжение таблицы 6.8

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	р
Pasteurellaceae	10 (17.9%)	9 (56.3%)	0,004
Coprobacillaceae	8 (14.3%)	7 (43.8%)	0,017
Eggerthellaceae	1 (1.8%)	3 (18.8%)	0,033
Ruminococcaceae	19 (33.9%)	10 (62.5%)	0,048

Выявленные различия, рассчитанные с использованием точного критерия Фишера, указывают на существенное влияние состава микробиоты ткани яичка на успешность применения ВРТ. Уменьшение доли представителей указанных семейств у пациентов с неудачным исходом может отражать утрату метаболически важных и иммуномодулирующих бактерий, способствующих поддержанию локального гомеостаза и полноценному сперматогенезу.

Анализ частоты встречаемости таксонов в микробиоте уретры выявил аналогичные закономерности (Таблица 6.9).

Таблица 6.9 – Бактериальные семейства, для которых выявлены статистически значимые различия представленности в микробиоте ткани уретры пациентов с НОА в зависимости от результатов ВРТ, абс. (%)

Семейство	Группа 1А (НОА, ВРТ-), n=56	Группа 1Б (НОА, ВРТ+), n=16	р
Enterococcaceae	8 (14.3%)	7 (43.8%)	0,017
Streptococcaceae	36 (64.3%)	5 (31.3%)	0,024
Brevibacteriaceae	3 (5.4%)	4 (25.0%)	0,039
Unassigned	28 (50.0%)	3 (18.8%)	0,043
Burkholderiaceae_A_580492	22 (39.3%)	11 (68.8%)	0,048

Кроме того, повышенная частота таксонов, отнесённых к категории неопределённых (Unassigned), в группе ВРТ- может свидетельствовать о дисбалансе и повышенной доле потенциально патогенных или малоизученных

микроорганизмов, способствующих нарушению микробного равновесия. Также статистически значимо чаще в группе ВРТ+ встречается семейство *Burkholderiaceae_A_580492*, что, вероятно, отражает роль этого таксона в поддержании благоприятного микробиального климата уретры.

Таким образом, анализ полученных данных подтвердил, что успешность применения ВРТ у пациентов с НОА ассоциируется с более частым присутствием определённых бактериальных семейств как в ткани яичка, так и в уретральной микробиоте. Отсутствие или редкое обнаружение этих таксонов в группах с отрицательным исходом ВРТ свидетельствует о возможном неблагоприятном влиянии микробиального дисбаланса на репродуктивный потенциал. Эти данные подчеркивают перспективность дальнейшего изучения микробиоты как фактора, влияющего на эффективность ВРТ, и могут служить основой для разработки микробиомно-ориентированных терапевтических стратегий.

6.6 Сравнение таксономического состава микробиоты ткани яичка и уретры на уровне семейств у пациентов с ОА в зависимости от результатов применения ВРТ

Проведён сравнительный анализ таксономического состава микробиоты ткани яичка у пациентов с ОА в зависимости от результата применения ВРТ (Таблица 6.10).

Таблица 6.10 – Бактериальные семейства, относительная представленность которых статистически значимо различается в микробиоте ткани яичка у пациентов с ОА в зависимости от результатов ВРТ, $M \pm m$

Семейства	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13	p
<i>Streptosporangiaceae</i>	0,131±0,081	0	0,003
<i>Bacillales_B</i>	0,207±0,089	0	0,003
<i>Beijerinckiaceae</i>	0,332±0,139	0	0,005

Продолжение таблицы 6.10

Семейства	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13	p
Burkholderiales;f__SG8-39	0,119±0,059	0	0,006
Rhodanobacteraceae_613067	0,193±0,131	0	0,006
Legionellaceae_A	0,025±0,025	0,21±0,15	0,007
Streptomycetaceae	0,970±0,910	0	0,01
c__Actinomycetia;__;__	0,144±0,071	0,004±0,004	0,013
Oscillospiraceae_88309	0,271±0,109	0,004±0,004	0,017
c__Bacilli;o__RFN20;_	0,382±0,244	0	0,020
Xanthobacteraceae_503485	0,137±0,069	0	0,020
o__Mycobacteriales;__	0,007±0,007	0,223±0,134	0,025
Bacillaceae_H_289398	1,188±0,547	0	0,030
Usitatibacteraceae	0,058±0,037	0	0,031
Halomonadaceae	0,399±0,123	0,059±0,044	0,032
Bacteroidaceae	3,118±1,721	0,423±0,192	0,037
o__Bacillales_B_302584;f__ DSM-18226_301387	0,140±0,082	0	0,038
Marinococcaceae	0,403±0,155	0,047±0,047	0,038
Gemmatimonadaceae	0,166±0,093	0,012±0,008	0,045
Actinomycetaceae	0,165±0,063	0,067±0,067	0,047
Tepidisphaeraceae	0,087±0,051	0,009±0,009	0,050

Анализ выявил статистически значимые различия в относительной представленности 19 бактериальных семейств между группами с отрицательным (группа 2А) и положительным (группа 2Б) результатом ВРТ. У пациентов с отрицательным результатом ВРТ наблюдается значительное снижение представленности таких семейств как Streptosporangiaceae, Bacillales_B и Beijerinckiaceae, среди прочих, что может свидетельствовать о нарушении микробного разнообразия и функциональности в этих случаях.

Семейства бактерий, имеющие меньшую представленность при отрицательных результатах ВРТ, включают организмы, способствующие продуцированию биоактивных метаболитов, и влияют на иммунный статус ткани яичка. В то же время, в микробиоте пациентов с положительными результатами ВРТ наблюдается более высокая представленность таких семейств как

Legionellaceae_A, Halomonadaceae и Bacillaceae_H_289398, что может свидетельствовать о их роли в поддержании баланса микробиоты и оптимальной микросреды.

Полученные данные указывают на существенное изменение структуры микробного сообщества в зависимости от результатов ВРТ, что подчеркивает важность микробиоты в контексте патологии яичек и её возможного влияния на клинические исходы лечения.

Анализ микробиоты уретры также продемонстрировал статистически значимое снижение представительства 5 бактериальных семейств у пациентов с ОА и отрицательным результатом ВРТ. Так, Burkholderiaceae_A, Chitinophagaceae, c_Polyangia, Obscuribacteraceae и Peptoniphilaceae значительно менее представлены в группе ВРТ- по сравнению с ВРТ+ (Таблица 6.11). Повышенная представленность этих таксонов у пациентов с успешным исходом ВРТ может отражать нормализацию микробного баланса и функциональное восстановление местного микробного сообщества, что потенциально способствует улучшению условий для сперматогенеза и повышения эффективности ВРТ.

Таблица 6.11 – Бактериальные семейства, относительная представленность которых в микробиоте уретры у пациентов с ОА статистически значимо различается в зависимости от результатов ВРТ, $M \pm m$

Семейство	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13	p
Burkholderiaceae_A	0,001±0,001	1,64±1,08	0,005
Chitinophagaceae	0,009±0,008	0,31±0,13	0,008
c_Polyangia	0	0,05±0,03	0,01
Obscuribacteraceae	0,157±0,157	1,72±1,05	0,034
Peptoniphilaceae	7,18±2,38	21,12±6,17	0,044

В целом полученные данные демонстрируют, что у пациентов с ОА микробиота ткани яичка и уретры у лиц с положительным результатом ВРТ характеризуется более сбалансированным и богатым таксономическим составом. При этом наличие или отсутствие ряда бактериальных семейств может играть ключевую роль в формировании микробного микроокружения, способствующего

или препятствующего достижению беременности. Эти результаты подчеркивают важность микробиомных характеристик как потенциальных биомаркеров прогноза и перспективных мишеней для микробиальной терапии в рамках ВРТ.

Анализ результатов, представленных в Таблице 6.12, позволяет констатировать, что у пациентов с ОА и ВРТ- выявлено статистически значимое повышение частоты встречаемости трёх бактериальных семейств по сравнению с группой ВРТ+.

Таблица 6.12 – Бактериальные семейства, для которых выявлены статистически значимые различия представленности в микробиоте ткани яичка пациентов с ОА в зависимости от результатов ВРТ, абс. (%)

Семейство	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13	p
Beijerinckiaceae	8 (42,1%)	0	0,010
Actinomycetaceae	8 (42,1%)	1 (7,7%)	0,049
Oscillospiraceae	8 (42,1%)	1 (7,7%)	0,049

Данная закономерность свидетельствует о возможном участии этих таксонов в формировании неблагоприятного микробного окружения, ассоциированного с нарушением сперматогенеза или локальной иммунной дисфункцией, что отрицательно сказывается на эффективности репродуктивных вмешательств.

При сравнении микробиоты уретры у пациентов с ОА выявлено, что у группы ВРТ- значительно реже встречаются семейства *Burkholderiaceae*, *Polyangia* и *Chitinophagaceae* по сравнению с пациентами с положительным результатом ВРТ (Таблица 6.13).

Таблица 6.13 – Бактериальные семейства, для которых выявлены статистически значимые различия представленности в микробиоте ткани уретры пациентов с ОА в зависимости от результатов ВРТ, абс. (%)

Семейство	Группа 2А (ОА, ВРТ-), n=19	Группа 2Б (ОА, ВРТ+), n=13	P
Burkholderiaceae	1 (5.3%)	7 (53.8%)	0,003
Polyangia	0 (0.0%)	4 (30.8%)	0,012
Chitinophagaceae	2 (10.5%)	6 (46.2%)	0,038

Снижение частоты представителей этих семейств у лиц с отрицательным исходом может свидетельствовать о нарушении микробного баланса уретральной среды, которая в норме способствует поддержанию локального иммунного гомеостаза и благоприятному репродуктивному потенциалу. Особенно заметна разница по семейству *Burkholderiaceae*, играющему, по данным ряда исследований, важную роль в микробиомной регуляции слизистых оболочек.

Таким образом, полученные данные подтверждают значимое влияние специфического состава микробиоты ткани яичка и уретры на исход применения ВРТ у пациентов с ОА. Наличие повышенной частоты *Veijerinckiaceae*, *Actinomycetaceae* и *Oscillospiraceae* в ткани яичка при ВРТ- указывает на потенциальное участие этих таксонов в патогенезе неблагоприятных исходов, в то время как сниженная представленность *Burkholderiaceae*, *Polyangia* и *Chitinophagaceae* в уретре может отражать дисбиоз, способствующий репродуктивным нарушениям. Данные результаты подчеркивают перспективность изучения микробиоты как прогностического фактора и возможной мишени для коррекции с целью повышения эффективности ВРТ.

6.7 Разработка классификационной модели прогноза эффективности программ ВРТ на основе характеристик микробиоты яичка и уретры у пациентов с необструктивной азооспермией

Для оценки прогностической значимости микробиоты тканей яичка и уретры у пациентов с НОА в контексте результата применения ВРТ была разработана классификационная модель с использованием алгоритма дерева решений. Анализ проводился только для пациентов с НОА, поскольку объём выборки в группе ОА оказался недостаточным для построения статистически надёжной модели. В качестве входных параметров использовались данные о наличии или отсутствии определённых бактериальных таксонов, преимущественно идентифицированных до уровня вида, что позволяет в дальнейшем адаптировать модель для практического применения.

Наиболее точная модель, построенная на основе микробиоты ткани яичка, представлена на Рисунке 6.6. Она обеспечивает правильную классификацию положительных исходов ВРТ (ВРТ+) в 93,75% случаев (15 из 16 пациентов) и отрицательных исходов (ВРТ-) в 91,1% случаев (51 из 56 пациентов). Общая точность модели составила 91,9%.

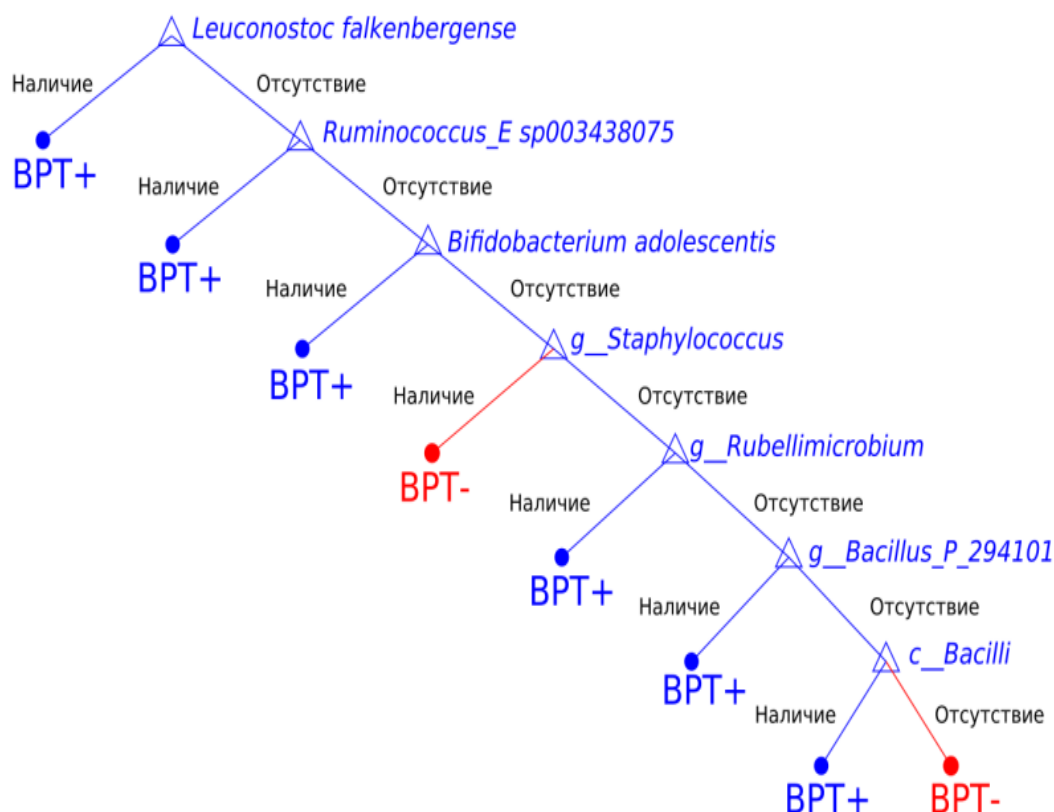


Рисунок 6.6 – Модель прогноза результатов применения программ ВРТ на основе видового состава микробиоты яичка

Ключевыми дискриминантными таксонами, включёнными в модель, оказались *Leuconostoc falkenbergense*, *Ruminococcus_E sp003438075*, *Bifidobacterium adolescentis*, *g_Staphylococcus*, *g_Rubellimicrobium*, *g_Bacillus_P_294101* и *c_Bacilli*. Присутствие некоторых видов, в частности *Bifidobacterium adolescentis* и *Leuconostoc falkenbergense*, ассоциировалось с благоприятными исходами ВРТ, тогда как отсутствие *c_Bacilli* и наличие *g_Staphylococcus* повышало вероятность неудачи.

Модель, основанная на характеристиках микробиоты уретры, представленная на Рисунке 6.7, показала высокую специфичность при умеренной

чувствительности. Она позволила корректно предсказать 68,75% положительных результатов ВРТ (11 из 16 пациентов) и 98,2% отрицательных результатов (55 из 56 пациентов), обеспечивая общую точность классификации 91,2%.

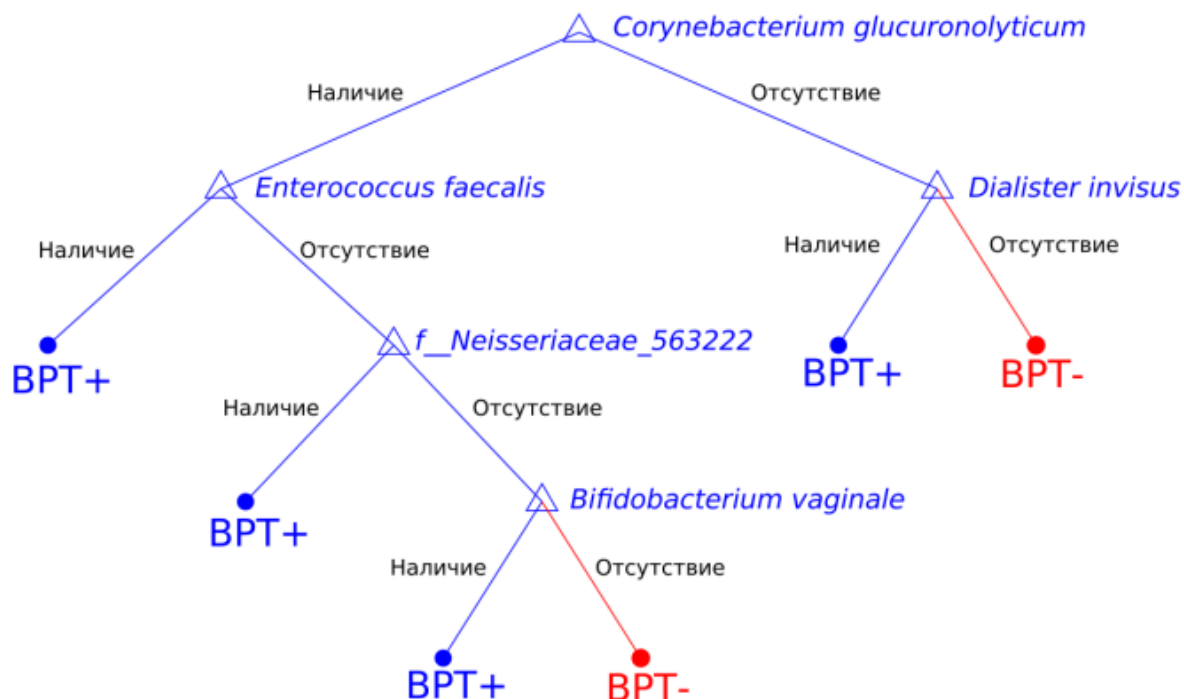


Рисунок 6.7 – Модель прогноза результатов применения программ ВРТ на основе видового состава микробиоты уретры

Наиболее значимыми признаками в данной модели явилось наличие таких представителей микробиоты, как *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Enterococcus faecalis*, *f_Neisseriaceae_563222*, *Bifidobacterium vaginale* и *Dialister invisus*. Отсутствие *Dialister invisus* и *Bifidobacterium vaginale*, что чаще наблюдалось у пациентов с успешным результатом ВРТ.

Таким образом, полученные модели демонстрируют высокую прогностическую ценность характеристик микробиоты, особенно при анализе ткани яичка. Применение разработанных зависимостей позволит осуществлять персонализацию подходов к лечению бесплодия у мужчин с НОА и может стать основой для разработки микробиологических диагностических тестов, направленных на оценку репродуктивного прогноза при планировании проведения ВРТ.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным специалистов Всемирной организации здравоохранения нарушение репродуктивного здоровья мужчин на сегодняшний день является не только медицинской, но и социальной проблемой [32]. Известно, что мужской фактор бесплодия выявляется в 50% случаев бесплодных браков. Крайней формой мужского бесплодия является азооспермия. Распространенность азооспермии в популяции всех мужчин составляет примерно 1%, среди бесплодных мужчин – 7-10% [2]. НОА представляет собой патологическое состояние, характеризующееся нарушением процесса созревания сперматозоидов или их полным отсутствием, и является наиболее серьезной причиной мужского бесплодия [86]. После внедрения в клинику ВРТ у пациентов с НОА появился шанс на биологическое отцовство, однако частота наступления беременности и рождения ребенка при этом виде азооспермии составляет не более 27%.

В большинстве случаев НОА возникает при нарушении сперматогенеза, связанного с генетическими, эндокринными, а также воспалительными заболеваниями. Однако, недавние исследования показали, что микробиота кишечника и урогенитального тракта также играет немаловажную роль в развитии репродуктивной системы [279].

Появляется все больше доказательств того, что изменения структуры микробного сообщества тестикулярной ткани является ключевыми факторами не только репродуктивного здоровья, но и связанных с ним заболеваний. Дисбиоз микробиома репродуктивного тракта может вызывать репродуктивную физиологическую дисфункцию и вызывать сопутствующие заболевания и неблагоприятные исходы беременности [267].

До недавнего времени считалось, что моча и сперма здорового мужчины не содержат бактерий или что бактерии присутствуют лишь изредка [202]. Однако, молекулярная диагностика позволила обнаружить многочисленные бактерии и вирусы в моче и сперме здоровых мужчин. В частности, современные лабораторные технологии, такие как NGS, позволили проводить тщательный

анализ сложных микробных сообществ в различных областях человеческого тела, в том числе и репродуктивной системе [47]. Использование методов секвенирования при анализе спермы показало, что человеческая сперма не стерильна и содержит специфическую флору, функции которой еще полностью не изучены. Кроме того, неясно происхождение этих микроорганизмов [202].

Одной из важнейших проблем в изучении структуры микробиома тестикул является ограниченность представлений об этих микробных сообществах. В целом неясно, как формируется и поддерживается бактериальный спектр репродуктивного тракта. Более того, существует лишь несколько исследований относительно роли, которую они могут играть в организме хозяина и функциональных репродуктивных процессах. Сравнение бактериальных сообществ, обнаруженных при секвенировании 16S рРНК в сперме, моче и мазках из прямой кишки здоровых мужчин, показало, что только 2,3% идентифицированных таксонов были общими для этих трех сред и 10% для спермы и мочи [119].

В настоящее время публикуется большое количество исследований о связи между микроорганизмами и мужским бесплодием, однако микробиом тестикулярной ткани изучен недостаточно в сравнении с другими системами и органами. Поэтому разработка новых биомаркеров мужского бесплодия имеет решающее значение для улучшения диагностики и прогноза этого заболевания.

В связи с вышеизложенной целью исследования явилось улучшение результатов диагностики и лечения больных с мужским фактором бесплодия на основании углубленной оценки патогенного тестикулярного микробиома у инфертильных мужчин.

Проведен ретроспективный и проспективный анализ данных 108 пациентов, проходивших обследование по поводу мужского бесплодия.

На первом этапе исследования было выполнено обоснование и апробация применения метода прогноза необходимости применения ВРТ с донацией сперматозоидов при идиопатическом бесплодии у мужчин на основании иммуноморфологических характеристик ткани яичка при нарушениях

сперматогенеза. Этап включал экспериментальное исследование роли СРАЗ-позитивных тучных клеток яичка в нарушениях сперматогенеза, в ходе которого было проведено исследование распределения тучных клеток в семенных канальцах при различных видах азооспермии и дана цитоморфологическая характеристика СРАЗ-позитивных тучных клеток у пациентов с различными формами азооспермии.

Репродукция представляет собой сложный процесс, в основе которого лежит взаимодействие эндокринной и иммунной систем и микробиоты. Тестикулярный иммунитет характеризуется так называемой иммунной привилегией, механизмом, который позволяет избежать аутоиммунных атак против белков, экспрессируемых сперматозоидами [79, 297, 315]. В то же время тестикулярная ткань обладает эффективным локальным врожденным и адаптивным иммунитетом [8, 148]. Тучные клетки /мастоциты являются одной из наиболее значимых популяций иммунных клеток в яичках [34]. Они вносят свой вклад в иммунную привилегию яичка и гомеостаз, который они поддерживают благодаря своей общей роли в регуляции проницаемости сосудов и иммуномодуляции, а также они играют предположительную роль в сперматогенезе [45]. Однако, в последнее время дискутируется вопрос об участии тучных клеток в неконтролируемых воспалительных реакциях при различных клинических патологиях [37]. Показано участие тучных клеток в патогенезе эндометриоза, болезни Крона и воспалительных заболеваний кишечника, а также в развитии легочного и печеночного фиброза [13]. Специфические пути регуляции тучных клеток при тестикулярных патологиях остаются невыясненными. Вместе с тем, считается, что в яичках человека увеличение количества интерстициальных мастоцитов приводит к нарушению сперматогенеза и, следовательно, к мужскому бесплодию [76].

При проведении гистологического анализа, помимо оценки состояния семенных канальцев, большое внимание было обращено межканальцевой структуре паренхимы яичка. Оценивали состояние микроциркуляторного русла и соотношение клеток Лейдига, фибробластов, макрофагов. Утолщение интимы и

склероз наружной оболочки кровеносных сосудов свидетельствовал об атеросклерозе. Кроме того, нами выявлены повреждения и дегенерация клеток Лейдига, которые часто сопутствуют нарушениям сперматогенеза. Гистопатологический анализ выявил положительную ИГХ-реакцию на триптазу мастоцитов (анти-МСТ), которая проявлялась окрашиванием в виде гранулированного цитоплазматического узора, ограниченного тучными клетками (некоторые из них с дегрануляцией).

В результате при проведении гистологического исследования у пациентов с азооспермией и с бедной палитрой микробного пейзажа было отмечено большое количество мастоцитов практически в 83% случаев в межканальцевой строме. В свою очередь, мастоциты в канальцевых структурах встречаются в 68% случаев и коррелируют с микробиотой.

Установленное локальное увеличение количества тучных клеток в корреляции с нарушениями микробного сообщества может быть важным фактором, приводящим к необратимым изменениям в тестикулярной ткани и бесплодию у мужчин. Учитывая вышеизложенные данные, можно представить развитие мужского бесплодия в виде порочного круга инфертильности (Рисунок 7.1).



Рисунок 7.1 – Основные звенья патогенеза мужского бесплодия: взаимодействие иммунной системы и инфекционных агентов

В ряде исследований была показана тесная взаимосвязь повышения миграции тучных клеток в интерстиций яичка и степенью нарушения сперматогенеза [145, 350]. Карбоксипептидаза А3 является одной из трех специфических протеаз тучных клеток, и удобной мишенью для определения численности интраорганный популяции ТК [61]. Результаты проведенного нами исследования показали, что цитотопографические особенности СРАЗ в интерстиции яичка не отличаются от характеристик данной специфической протеазы, показанных нами в ТК другой органной принадлежности. Биогенез и накопление СРАЗ в ТК яичка свидетельствуют о постепенном накоплении специфической протеазы в гранулах по мере их созревания и дальнейшей аккумуляции в качестве преформированного медиатора. Мы можем считать, что ТК яичка содержат высокие уровни СРАЗ, содержание которой динамично меняется в зависимости от условий тканевого микроокружения яичка, в том числе при формировании азооспермии.

Обнаружение ТК с крупными секреторными гранулами, в которых СРАЗ локализована преимущественно по периферии, свидетельствует об активных процессах секреции протеазы во внеклеточный матрикс, во время которых протеаза извлекается из внутригранулярных хранилищ и активно транспортируется посредством различных секреторных путей через цитоплазму к молекулярным мишеням внеклеточного матрикса. По нашим результатам мы можем считать, что описанные ранее две группы ТК в интерстиции яичка, в том числе «интерстициальные», расположенные между клетками Лейдига, вокруг кровеносных сосудов и другими клетками, и «перитубулярные» тучные клетки, расположенные в непосредственной близости от собственной пластинки канальцев или включенные в саму собственную пластинку, являются источником СРАЗ в интерстиции яичка [247]. Обнаружение феномена выведения отдельных секреторных гранул в тканевое микроокружение междуктального интерстиция с формированием отдельных полей на значительной площади при НОА является объективным подтверждением участия СРАЗ в формировании как провоспалительного фона, так и профиброгенных тканевых ниш, в которых

создаются благоприятные индуктивные условия по чрезмерному образованию волокнистого компонента внеклеточного матрикса, в частности, эластических волокон.

Действительно, ранее было показано, что СРАЗ является участником механизмов воспаления, способствуя активации провоспалительных биологически активных веществ, пептидов и ферментов, и может в некоторой степени определять модуляцию развития иммунных реакций [61]. Обнаруженные в нашем исследовании данные, что у пациентов с НОА количество СРАЗ+ТК в интерстиции яичка превышает практически на 40% аналогичные показатели у мужчин с ОА, свидетельствуют о существовании при секреторной азооспермии механизмов увеличения интраорганной популяции ТК, в частности, благодаря повышенного рекрутирования предшественников ТК из микроциркуляторного русла [145]. Очевидно, в этом могут принимать участие и сами ТК, поскольку их количество вокруг капилляров возрастает при необструктивной форме азооспермии. Об этом свидетельствует и анализ пространственной локализации СРАЗ+ТК в ландшафте тканевого микроокружения яичка пациентов с НОА, показавший возрастание их содержание в перитубулярном или периваскулярном интерстиции практически в 4 раза при НОА по сравнению с обструктивной формой мужского бесплодия. При этом к вышеописанным фактам необходимо добавить и более высокую степень взаимодействия СРАЗ⁺ТК с клетками Лейдига и фибробластами при НОА. Обнаруженное нами большое количество полей тканевого микроокружения, инфильтрированной СРАЗ-позитивными гранулами с сохранением признаков их внутриклеточного строения свидетельствуют о пролонгации оказываемых эффектов на мишени тканевого микроокружения, даже в отсутствии ТК. Миграция ТК в зону ГТБ с признаками секреции СРАЗ свидетельствуют о тесной вовлеченности специфической протеазы ТК в регуляцию сперматогенеза. Кроме того, особенности гистотопографии СРАЗ⁺ТК с близким расположением к ядрам соседних соматических клеток открывает широкое поле для дискуссии относительно эпигенетических эффектах СРАЗ. В частности, такие эффекты были показаны для другой специфической протеазы ТК

– триптазы, в том числе в опухолевом микроокружении [111, 191].

Таким образом, можно предположить, что полученные в работе данные могут быть одним из объяснений, в связи с чем большое количество пациентов с поврежденным сперматогенезом в группе пациентов с НОА не имеют перспектив его полного восстановления, что негативно отразится на результатах биопсии яичка и ВРТ. Хроническое воспаление, которое поддерживают тучные клетки с помощью СРАЗ, способствует угнетению сперматогенеза в необструктивной группе мужского бесплодия. Поэтому мужчины с НОА вынуждены обращаться к ВРТ (ЭКО/ИКСИ, вплоть до использования донорской спермы), чаще по сравнению с мужчинами с ОА для возможности оплодотворить яйцеклетку супруги. Поскольку исследования корреляции сперматогенеза и СРАЗ⁺ТК ранее не проводилось, данные настоящего исследования являются первым доказательством обратной связи количества ТК в интерстиции яичка со степенью нарушения сперматогенеза.

Известно, что миоидные клетки и клетки Лейдига являются двумя важными источниками тестикулярного ССЛ2 при сперматогенной дисфункции [145]. Очевидно, что этими фактами можно объяснить более высокую частоту солокализации СРАЗ⁺ТК с клетками Лейдига и миоидными клетками при нарушении сперматогенеза. Известно, что гистамин ТК может влиять на стероидогенез в клетках Лейдига, действуя через рецепторы H1R и H2R [141]. В эксперименте на лабораторных животных было показано, что пролиферация и дифференцировка ТК и клеток Лейдига происходят в семенниках крыс одновременно, указывая на существование динамических взаимоотношений между двумя типами клеток через их секреторные продукты. Очевидно, что при НОА для интенсификации сперматогенеза необходимо активизировать гормон-продуцирующую активность клеток Лейдига.

Поскольку ТК яичка являются основным источником локально продуцируемого гистамина [141], обнаруженные нами свидетельства возрастания солокализации ТК с клетками Лейдига свидетельствуют об активирующем влиянии ТК как с помощью гистамина, так и, вероятно, СРАЗ. В то же время, другие

выделяемые медиаторы ТК могут способствовать изменению состояния интегративно-буферной метаболической среды и провоцировать фиброз интерстиция яичек. Мы считаем, что в таких условиях может сформироваться порочный круг, в котором рациональные действия ТК по активизации гормон-продуцирующей активности клеток Лейдига может сопровождаться провокацией локальной воспалительной реакции и формированию профиброгенных тканевых ниш. Дальнейшее внимание к биологии ТК при НОА может стать источником новых эффективных решений в персонифицированной медицине.

Таким образом, обнаруженное по результатам нашего исследования активное участие СРАЗ в регуляции тканевого микроокружении интерстиция яичка открывает новые перспективы в понимании механизмов развития нарушения сперматогенеза.

Несмотря на мощный иммунный арсенал мужских гонад и наличие собственной микробиоты поражение яичка возможно патогенами из уретры, а также патогенной флорой, передающейся половым путем [53]. Под воздействием инфекционного агента происходит нарушение целостности гематотестикулярного барьера и активация локального иммунного ответа с синтезом и продукцией медиаторов воспаления. В свою очередь эти события приводят к изменению уникального микробного ландшафта уrogenитального тракта и гонад.

На следующем этапе работы была произведена разработка малоинвазивных методов выделения бактериальной ДНК из биоптата ткани ПЖ (патент) и выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин (патент). Применение этих методов позволило охарактеризовать нарушения микробиома в тестикулярной ткани у пациентов с нарушениями сперматогенеза на основе исследования бактериальной ДНК методом высокопроизводительного секвенирования NGS для определения таксономического состава на основе семейств и видов микроорганизмов и идентифицировать наличие таксономического разнообразия тестикулярного микробиома у пациентов с различными видами азооспермии.

Установлено, что у пациентов с азооспермией в тестикулярной ткани

достоверно чаще обнаруживаются представители *Enterobacteriaceae* и *Xanthomonadaceae* семейств, родов *Fingoldia*, *Bifidobacterium*, *Porphiromonas*, *Prevotella*, *Peptoniphilus* и *Pseudomonas*. Особое место занимают представители рода *Prevotella*, которые у пациентов с НОА встречаются в большом количестве, а у пациентов с ОА в очень малых, вплоть до полного отсутствия. По данным литературы, умеренное количество *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Gardnerella* и в том числе *Prevotella* обнаруживаются в образцах семенной жидкости здоровых мужчин [77].

Нарушение целостности ГТБ приводит к увеличению количества тучных клеток в соединительной ткани, с последующим нарушением таксономической структуры микробиоты тестикул [115]. Известно, что мастоциты широко распространены в соединительных тканях, могут участвовать как в острых, так и хронических воспалительных реакциях. А триптаза, вырабатываемая мастоцитами, вызывает пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, что приводит к фиброзу и склерозу тканей [34, 115]. При проведении корреляционного анализа у пациентов с азооспермией и с бедной палитрой микробного пейзажа было отмечено, что значительно больше мастоцитов в строме обнаруживается у пациентов в группе 2 ($p < 0,05$). И чем больше количество мастоцитов в строме обнаруживается у пациентов с ОА, тем у них меньше разнообразие микробиоты уретры.

Результаты сравнительного анализа таксономической структуры микробиоты тестикул и уретры пациентов с НОА в протоколах ВРТ свидетельствуют о том, что в тестикулярной ткани существует большое разнообразие микроорганизмов, а также исключает потенциальный вклад микробных сообществ нижележащего урогенитального тракта. Определение видового бактериального состава микробиоты тестикул имеет решающее значение для лучшего понимания этиологии и патогенеза инфекций урогенитального тракта и их связи с бесплодием. Несмотря на то, что только 9% микробиоты человека было обнаружено в урогенитальном тракте [279], благодаря современным методам NGS нам удалось выявить особенности таксономической

структуры данного микробного сообщества.

Хотя индексы альфа – разнообразия не выявили существенных различий между группами, отличия относительной представленности и частоты встречаемости были обнаружены в исследованных образцах. Установлено, что колонизация представителями фило *Fusobacteriota* была обнаружена в обеих группах, но преобладала в образцах пациентов группы с НОМ. *Fusobacteriota* представляют собой грамотрицательные анаэробные бациллы с ареалом обитания во рту человека, желудочно-кишечном тракте и других местах. Помимо этого, некоторые исследования выявили обогащение ДНК *Fusobacteriota* в метастатических абсцессах почки, а также в тканях колоректального рака по сравнению с прилегающими тканями [60].

Выявлены 13 доминирующих семейств, принадлежащих к филам *Firmicutes*, *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*, при этом большая часть относительной бактериальной представленности приходится на группу пациентов с положительным результатом ВРТ. Кроме того, бактерии выявленных нами таксонов (*Dialisteraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae_256921*, *Acutalibacteraceae*) более характерны для ротовой и кишечной микрофлоры, тогда как представители семейства *Burkholderia* связаны с легочными инфекциями человека, а именно с хронической гранулематозной болезнью и муковисцидозом.

Следует отметить, что полученные нами данные по выявленным микроорганизмам не соотносятся с результатами ряда исследований. В частности, по данным Alfano M. et al. (2018), 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*. Такие отличия могут быть следствием различий в культуре, образе жизни и кулинарных традициях [298].

Кроме того, в микробиоте ткани яичка пациентов обеих групп чаще всего встречались представители семейства *Lactobacillaceae*: в группе пациентов с НОМ – в 87,5% случаев, в группе с ОА – в 54,3% случаях. Известно, что у здоровых женщин преобладают бактерии *Lactobacillus*, которые выполняют

множество защитных функций, оказывают влияние на естественную беременность [238] и результаты ЭКО [338]. В мужской микробиоте *Lactobacillus* могли оказывать влияние на параметры качества спермы.

Необходимо отметить, что большинство таксонов, обнаруженных нами в повышенной концентрации в тестикулярной ткани пациентов с НОА, представляют собой грамотрицательные бактерии, содержащие в клеточных стенках липополисахарид, который в свою очередь может активировать цитокины, вызывающие воспаление [165]. Продемонстрировано, что медиаторы воспаления могут напрямую вызывать фрагментацию ДНК в сперматозоидах, что в конечном итоге ограничивает способность зародышевых клеток к оплодотворению [78, 231].

Сравнительный анализ микробиоты уретры показал следующее. Альфа – разнообразие образцов из уретры было значительно ниже, чем в тестикулярной ткани. Несмотря на это отмечено статистически значимое увеличение относительной представленности филы *Actinobacteriota*, семейств *Enterococcaceae* и *Brevibacteriaceae* у пациентов с положительными результатами ВРТ [166]. Данные литературы подтверждают, что здоровый микробиом уретры прост, стабилен и может быть связан с воздействием окружающей среды, однако таксономическое разнообразие в большинстве исследований было низким [69].

Проведенное исследование показало, что численность бактерий у пациентов с различными вариантами азооспермии существенно варьирует. При этом достоверно отличающиеся по частоте встречаемости бактериальные семейства в микробиоте в тестикулярной ткани, например, выше, чем в уретре. Очевидно, что изменение микробного состава может привести к возникновению дисбиоза, который, в свою очередь, может влиять на фертильность и макроскопические нарушения показателей спермы. Также следует отметить, что у генетически восприимчивого хозяина дисбаланс взаимодействий микробиоты и иммунной системы в определенных условиях может выступать в качестве одного из ключевых звеньев патогенеза иммуноопосредованных нарушений, приводящих к репродуктивным потерям [8, 127].

Таким образом, проведенное исследование показало, что изменения спектра микробиоты половых путей оказывает специфическое влияние на репродуктивную систему, а коррекция аномальных микробиомов может привести к улучшению репродуктивных результатов.

Полученные нами данные свидетельствуют, что выявленные изменения в таксономической структуре микробиоты тестикул могут быть связаны с низкими уровнями ингибина В и тестостерона. Например, некоторые виды бактерий могут ухудшать функцию клеток Лейдига, которые отвечают за выработку тестостерона [317]. Сравнение полученных характеристик микробиоты и уровней ингибина позволило установить, что при увеличении разнообразия микробной флоры тестикулярной ткани наблюдается соответствующий рост уровня ингибина, что подтверждено данными корреляционного анализа нашего исследования для микроорганизмов *Beijerinckiaceae*, о *Vicinamibacterales*;f *UBA2999*, *Oscillospiraceae*, *Enterobacteriaceae*_A. Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал наличие ряда положительных статистически значимых корреляционных связей умеренной силы уровня ингибина и показателей микробиоты тестикулярной ткани. Эти данные свидетельствуют о взаимном влиянии нормальной микробиоты и эндокринной функции тестикул. По-видимому, определенные виды бактерий могут способствовать продукции метаболитов, которые, в свою очередь влияют на клеточную сигнализацию и гормональную активность.

Микробное разнообразие уретры, как правило, менее сложное по сравнению с другими слизистыми оболочками, такими как кишечник или вагинальная микрофлора. Однако показатели определенных бактериальных сообществ могут коррелировать со здоровьем мочевыводящих путей и репродуктивной системы [144]. Как и другая микробиота в организме, микробиота уретры важна как для поддержания здорового состояния так в аспекте развития различных патологических процессов. У здоровых мужчин наиболее распространенными бактериями являются *Lactobacillaceae*, *Corynebacteriaceae* и *Staphylococcaceae* [170]. При исследовании микробиоты уретры в группах сравнения, нами было

выявлено, что у пациентов с неудачными результатами ВРТ значительно увеличена относительная представленность фил *Actinobacteriacea* и *Proteobacteria* по сравнению с пациентами ВРТ+. Также в группе ВРТ- достоверно реже встречаются семейства *Burkholderiaceae_A*, *c_Polyangia*; *o_DRWM01*; *_* и *Chitinophagaceae* ($p < 0,05$). Микробиота уретры может играть защитную роль, предотвращая колонизацию и инфицирование патогенными бактериями. Эта колонизационная резистентность аналогична таковой, наблюдаемой в других микробных средах организма. Вероятно, микробиом взаимодействует с местной иммунной системой, помогает поддерживать сбалансированный иммунный ответ и предотвращает хроническое воспаление или инфекцию [130].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменения относительной представленности отдельных семейств в спектре микробиома урогенитального тракта может потенциально влиять на результаты проведения ВРТ. Эти данные позволяют выдвинуть гипотезу о «микробиоте фертильности тестикул», которая позволяет обосновать выполнение процедуры прегравидарной криоконсервации в программах ВРТ, а также способствовать разработке новых диагностических тестов, позволяющих осуществлять отбор сперматозоидов для использования в программах ВРТ.

На заключительном этапе работы были разработаны модели прогностической значимости микробиоты тканей яичка и уретры у пациентов с НОА в контексте результата применения ВРТ с использованием алгоритма дерева решений. В качестве входных параметров в этих моделях используются данные о наличии или отсутствии определённых бактериальных таксонов, преимущественно идентифицированных до уровня вида, что позволяет в дальнейшем адаптировать модели для практического применения.

Полученные модели демонстрируют высокую прогностическую ценность характеристик микробиоты, особенно при анализе ткани яичка. Применение разработанных зависимостей позволит осуществлять персонализацию подходов к лечению бесплодия у мужчин с НОА и может стать основой для разработки микробиологических диагностических тестов, направленных на оценку

репродуктивного прогноза при планировании проведения ВРТ.

Следует отметить, что разработка новой стратегии скрининга мужской infertility на основе молекулярных инструментов представляет собой насущную потребность. Действительно, экспрессия генов стала важным инструментом для диагностики, прогноза и стратегии лечения пациентов с данной патологией. В рамках нашего исследования разработан метод выделения бактериальной ДНК из биоптата яичка с целью характеристики тестикулярного микробиома у infertile пациентов, что является высокоактуальным при диагностике факторов мужского бесплодия.

Сопоставление собственных результатов исследования и данных литературы позволило нам предложить к применению в клиничко-лабораторной практике набора праймеров для проведения ПЦР при оценке микробиома уретры и ткани яичка мужчин с азооспермией. Обоснование применения праймеров с учетом их мишеней и литературных данных о влиянии микроорганизмов на сперматозоиды представлено в Таблице 7.1. По нашему мнению, использование подобного набора в рамках диагностического обследования пациентов в центрах репродуктологии позволит значительно повысить точность диагностики, будет способствовать персонализации ведения мужчин с азооспермией и повышению эффективности прогнозирования результатов участия пациентов в программах ВРТ.

Комплексный подход к диагностике мужского бесплодия закладывает основу для изучения причинно-следственной связи микробиома и иммунного ответа в естественных условиях, включая изменения количества и типов иммунных клеток. В этом аспекте исследование показало, что повреждения, вызванные мастоцитами в строме и канальцах взаимосвязаны с таксономической структурой микробиоты тестикулярной ткани. Кроме того, яички пациентов с необструктивной азооспермией имеют качественно и количественно более разнообразный спектр как на уровне семейств, так и родов, в отличие от пациентов с обструктивной азооспермией. Дальнейшие исследования в этом направлении могут рассмотреть не только новые критерии диагностики

азооспермии, но также обеспечить более целенаправленную иммунную таргетную терапию, возможно комбинированную иммунотерапию с терапией препаратами микрофлоры, что может быть более эффективным при лечении мужского бесплодия.

Таблица 7.1 – Патогенетическое обоснование предлагаемого набора праймеров, рекомендуемых при проведении ПЦР для оценки микробиома мужчин с азооспермией

Семейства Микроорганизмов (Phylum; Class; Order)	Род / вид микроорганизмов	Механизм действия / клиническая значимость	Действие на сперматозоиды	Рекомендуемые мишени ПЦР / гены	Примеры праймеров (последовательности)
Acutalibacteraceae (Firmicutes_A; Clostridia; Oscillospirales)	Acutalibacter spp.	Ассоциируется с дисбиозом, влияет на иммунный ответ, возможное опосредованное действие через метаболиты	Непосредственные клинические эффекты на сперму не подтверждены	16S rRNA (V3–V4 или V4–V5) в метагеномных исследованиях; предлагается разработать генноспецифические праймеры по 16S	Универсальные 16S праймеры (например, 341F/806R)
Pasteurellaceae (Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales)	Haemophilus spp., Aggregatibacter spp.	Способны вызывать хроническое воспаление уrogenитального тракта; потенциально негативно влияют на сперматогенез при инфекции	Потенциальное снижение жизнеспособности и подвижности сперматозоидов при хронической инфекции	16S rRNA (видоспецифические мишень, например, hpd for <i>H. influenzae</i> in respiratory studies) или видоспецифическая ПЦР	Мишени hpd-праймеров, 16S-праймеры
Flavobacteriaceae (Bacteroidota; Bacteroidia; Flavobacteriales)	Flavobacterium spp., Chryseobacterium spp.	Анаэробные/факультативные анаэробные; по данным NGS-исследований семенной микробиоты связаны с дисбиозом; вызывают воспаление, опосредованное цитокинами	Связь с уменьшением подвижности и нарушениями морфологии сперматозоидов показана в отдельных исследованиях	16S rRNA (генно-/видоспецифические праймеры 16S) или функциональные гены (например, <i>csIA</i> для <i>F. columnare</i>).	Видоспецифические 16S праймеры для <i>Flavobacterium</i>
Burkholderiaceae (Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Burkholderiales)	Burkholderia spp., Ralstonia spp. (<i>Ralstonia</i> Proteobacteria)	Некоторые представители (<i>Pseudomonas</i> -like и <i>Burkholderia</i>) выделяют токсичные ферменты; могут вызывать воспаление и нарушения сперматогенеза	Снижение подвижности и жизнеспособности сперматозоидов, зависит от вида микроорганизмов	<i>RecA</i> или <i>gyrB</i> для <i>Burkholderia</i> ; 16S. Для <i>Ralstonia</i> – 16S или генноспецифические мишени	<i>recA</i> праймеры BUR1/BUR2 и BUR3/BUR4, <i>gyrB</i> -based праймеры

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема мужского бесплодия в настоящее время приобретает не только медицинское, но и выраженное социально-демографическое значение. Особое место среди причин мужской инфертильности занимает азооспермия, прежде всего её необструктивная форма, характеризующаяся глубокими нарушениями сперматогенеза и низкой эффективностью применения вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на значительный прогресс репродуктивной медицины, молекулярные, иммунологические и микробиологические механизмы повреждения сперматогенного эпителия остаются недостаточно изученными, что ограничивает возможности ранней диагностики и персонализированного лечения пациентов.

Проведённое комплексное исследование, основанное на анализе данных 108 пациентов с различными формами азооспермии, позволило сформулировать новую концепцию патогенеза мужского бесплодия, интегрирующую иммунологические и микробиологические механизмы нарушения сперматогенеза. В работе впервые установлена патогенетическая роль СРАЗ-позитивных тучных клеток (СРАЗ+ТК) при НОА. Показано, что у пациентов с НОА содержание СРАЗ+ТК в интерстиции яичка достоверно выше, чем при обструктивной форме азооспермии, при этом их количество в перитубулярном и периваскулярном микроокружении отрицательно коррелирует со степенью сохранности сперматогенеза. Выявленная статистически значимая корреляция позволяет рассматривать СРАЗ в качестве перспективного биомаркера необратимых изменений тестикулярной ткани. Морфологические изменения при НОА сопровождаются выраженной иммунной перестройкой интерстициального микроокружения с локальной активацией тучных клеток и высвобождением провоспалительных медиаторов, что формирует патогенетический «порочный круг» повреждения сперматогенного эпителия, нарушение гомеостаза тестикулярной ткани и прогрессирование фиброзных изменений, способствующих развитию секреторной формы мужского бесплодия.

В работе впервые на основании высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК охарактеризован таксономический состав микробиоты тестикулярной ткани у пациентов с различными видами азооспермии. Продемонстрировано, что тестикулярный микробиом не является стерильным и характеризуется этиологически зависимыми паттернами колонизации: для НОА характерно обеднение микробного разнообразия, тогда как при обструктивной форме формируется более разнообразная микробная экосистема. Выявлены ключевые таксоны, ассоциированные с нарушением сперматогенеза (*Lactobacillaceae*, *Prevotella*, *Burkholderiaceae_A*, *Veillonellaceae*). Полученные данные подтверждают участие микробиологических факторов в нарушении иммунного гомеостаза тестикул и формировании хронического воспаления, приводящего к угнетению сперматогенеза.

В работе также показано наличие статистически значимых взаимосвязей между характеристиками тестикулярного микробиома, уровнем половых гормонов и показателями сперматогенеза. Выявленные корреляционные связи между определёнными бактериальными таксонами, уровнем ингибина В, тестостерона и гонадотропинов свидетельствуют о тесном взаимодействии микробиоты и эндокринной функции яичка. Это позволяет рассматривать микробиом тестикулярной ткани как один из факторов регуляции репродуктивной функции и потенциальный биомаркер сохранности сперматогенеза.

На основе полученных данных предложена гипотеза существования «микробиоты фертильности» тестикулярной ткани, определяющей репродуктивный потенциал мужчин и влияющей на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий. Научная новизна работы подтверждена разработкой и патентованием метода малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани, что позволило впервые провести сравнительный анализ микробиоты яичка и уретры у пациентов с азооспермией. Установлено, что таксономическая структура микробиоты тестикул ассоциирована с исходами программ ВРТ: выявлены семейства

(Acetivibacteraceae, Enterococcaceae, Brevibacteriaceae, Rikenellaceae), относительная представленность которых достоверно выше у пациентов с успешным результатом лечения. На основе идентифицированных дискриминантных таксонов (включая *Leuconostoc falckenbergense*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Enterococcus faecalis*) разработаны модели прогнозирования эффективности ВРТ с использованием алгоритма «дерево решений», обеспечивающие общую точность 91,9% для микробиоты яичка и 91,2% для микробиоты уретры.

Важным практическим результатом исследования стала разработка и апробация малоинвазивных методов выделения бактериальной ДНК из биоптатов тестикулярной ткани и ПЖ, что позволило значительно расширить возможности изучения микробиома мужских гонад. На основании полученных данных предложен набор диагностических праймеров для ПЦР-анализа микробиоты урогенитального тракта, позволяющий повысить точность лабораторной диагностики нарушений сперматогенеза.

Кроме того, разработаны прогностические модели оценки эффективности программ ВРТ у пациентов с НОА на основе анализа микробиоты ткани яичка и уретры.

Таким образом, проведенное исследование позволило сформировать новую концептуальную модель патогенеза мужского бесплодия, основанную на интеграции иммунологических и микробиологических механизмов повреждения тестикулярной ткани. Показано, что нарушения сперматогенеза формируются в результате сложного взаимодействия тестикулярного микробиома, локальных иммунных реакций и гормональной регуляции, что определяет необходимость комплексного мультидисциплинарного подхода к диагностике и лечению пациентов с азооспермией.

Научная новизна работы заключается в выявлении роли СРАЗ-позитивных тучных клеток в патогенезе нарушений сперматогенеза, характеристике таксономической структуры тестикулярного микробиома при различных формах

азооспермии, доказательстве его взаимосвязи с эндокринной функцией яичка и результатами применения ВРТ, а также в разработке новых молекулярно-диагностических методов и прогностических моделей оценки репродуктивного потенциала мужчин.

Практическая значимость исследования состоит в создании научно обоснованных подходов к персонализированной диагностике и лечению мужского бесплодия, включающих анализ тестикулярного микробиома, оценку иммуноморфологических характеристик ткани яичка и использование прогностических моделей эффективности ВРТ.

Перспективы дальнейших исследований включают: валидацию разработанных прогностических моделей на независимых клинических когортах с оценкой их чувствительности и специфичности; углублённое изучение молекулярных механизмов взаимодействия СРАЗ-позитивных тучных клеток с тестикулярным микробиомом и клетками Лейдига, включая роль специфических протеаз и цитокинов; оценку эффективности таргетной иммуномодулирующей терапии и пробиотической коррекции дисбиотических нарушений у пациентов с НОА в проспективных контролируемых исследованиях; а также внедрение разработанного набора праймеров для ПЦР-диагностики в рутинную клиническую практику центров репродуктологии с последующей оценкой диагностической и прогностической ценности. Реализация этих направлений позволит повысить эффективность диагностики и лечения мужского бесплодия, а также улучшить результаты применения ВРТ.

ВЫВОДЫ

1. У мужчин с азооспермией при морфологическом анализе нативных биоптатов яичка нарушения сперматогенеза характеризуются высокой частотой отсутствия сперматозоидов (81,9% у пациентов с необструктивной азооспермией, 17,7% – у пациентов с обструктивной азооспермией, $p < 0,001$), выраженными морфологическими признаками нарушения сперматогенеза ($2,77 \pm 0,71$ балла у пациентов с НОА и $5,83 \pm 0,93$ балла при ОА, $p = 0,001$). Наличие признаков нарушений сперматогенеза сопровождается повышением количества тучных клеток со специфической активной триптазой (СРАЗ+ТК) в семенных канальцах ($45,22 \pm 9,08$ клеток на 1 мм^2 ткани при НОА, $26,05 \pm 10,31$ при ОА, $p = 0,012$), что характерно для различных участков ткани яичка: перитубулярного, периваскулярного микроокружения и межтубулярного интерстиция и периваскулярного микроокружения. Корреляционный анализ подтверждает наличие статистически значимой взаимосвязи между выраженностью нарушений сперматогенеза и количеством СРАЗ+ТК в интерстиция яичка ($r = -0,763$, $p < 0,001$ при НОА и $r = -0,759$, $p = 0,004$ при ОА).

2. Метод малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани у инфертильных мужчин, предусматривающий интраоперационный забор образца тестикулярной ткани путем биопсии яичка с последующим забором материала из уретры, позволяет осуществлять углубленное изучение микробиоты тестикулярной ткани. Это способствует повышению эффективности диагностики репродуктивного потенциала мужчины и позволяет сформировать научно-обоснованный алгоритм выбора тактики преодоления мужской инфертильности, в том числе путем эффективного применения программ вспомогательных репродуктивных технологий.

3. Структура и таксономическое разнообразие микробиома тестикулярной ткани достоверно различаются у пациентов с обструктивной (ОА) и необструктивной (НОА) азооспермией, что было установлено в исследовании, проведенном методом NGS. Для группы НОА характерно статистически значимое

обеднение микробного сообщества (снижение альфа-разнообразия), в то время как при ОА формируется разнообразная и специфичная микробная экосистема. Общим для обеих групп является выявление колонизации ткани яичка представителями фил Firmicutes, Pseudomonadota, Bacteroidota и Fusobacteriota. Ключевым общим таксоном является семейство Lactobacillaceae, которое детектировалось в 87,5% случаев в группе ОА и в 54,3% случаев в группе НОА, что подтверждает его потенциальную роль в микробной экологии яичка независимо от этиологии нарушения сперматогенеза. Полученные данные свидетельствуют о наличии этиологически зависимых паттернов колонизации тестикулярной ткани и позволяют рассматривать особенности тестикулярного микробиома в качестве нового потенциального маркера для дифференциации форм мужского бесплодия.

4. Корреляционные связи между наличием микробных таксонов, уровнями половых гормонов, маркерами сперматогенеза, а также выраженностью воспалительных изменений являются статистически значимыми и могут указывать на возможную связь между сохранённой функцией поддерживающих клеток и наличием определённой тестикулярной микробиоты. В частности, концентрация ФСГ отрицательно коррелирует с численностью таксонов Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Veillonellaceae, Moraxellaceae, Pasteurellaceae, Xanthomonadaceae, уровень ЛГ отрицательно коррелирует с относительным содержанием Lactobacillaceae, Moraxellaceae, Porphyromonadaceae, Flavobacteriaceae, Dermatophilaceae, Sphingobacteriaceae и Salinicoccaceae. В противоположность этому уровень ингибина В, отражающий функциональную активность клеток Сертоли, положительно коррелирует с численностью бактериальных таксонов Bacteroidaceae, Burkholderiaceae_A, Pasteurellaceae, Aerococcaceae, Acutalibacteraceae и Coriobacteriaceae. Уровень тестостерона демонстрирует разнонаправленные корреляции: положительную с Bacteroidaceae и отрицательные с Dermabacteraceae и Pelagibacteracea.

5. Характеристики микробиоты уретры и тестикул статистически

значимо ассоциированы с выраженностью нарушений сперматогенеза, причем выявленные ассоциации носят этиологически специфичный характер. Для ОА характерно снижение в тестикулярной ткани численности потенциально протективных таксонов (*Dermabacteraceae*, *Pelagibacteraceae*), что указывает на дисбиоз и провоспалительный фон, усугубляющий повреждение сперматогенного эпителия. Для НОА обнаружены прямые корреляции между тяжестью поражения ткани яичка и увеличением обилия специфических бактериальных семейств (*Burkholderiaceae_A*, *Veillonellaceae* и др.), что позволяет рассматривать их как потенциальные маркеры или патогенетические агенты секреторного бесплодия. Выделен также ряд таксонов (*Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae* и др.), ассоциированных с бесплодием независимо от его формы, что определяет их в качестве общих микробных сигнатур. Полученные результаты подтверждают гипотезу о ключевой роли уретрального и тестикулярного микробиома в патогенезе идиопатического мужского бесплодия и открывают перспективы для разработки новых микробиом-ассоциированных диагностических и терапевтических стратегий.

6. Таксономическая структура микробиоты биоптатов ткани яичка ассоциирована с исходами программ ВРТ. У пациентов с успешным исходом ВРТ наблюдается статистически значимое увеличение относительной представленности бактериальных семейств *Acutalibacteraceae*, *Cellvibrionaceae*, *Coprobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Trueperaceae* и *Eggerthellaceae*. Повышение доли *Enterococcaceae* более чем в 10 раз, а также *Brevibacteriaceae*, *Microbacteriaceae* и *Rikenellaceae* в группе пациентов с положительным результатом применения ВРТ свидетельствует о формировании микробного профиля, менее склонного к провоспалительным реакциям и лучше адаптированного к физиологическому состоянию. Кроме того, при положительном исходе ВРТ отмечено снижение относительной представленности семейства *Streptococcaceae* и неопределённых таксонов, что может отражать снижение микробной нагрузки и восстановление таксономической

специфичности уретрального сообщества. У пациентов с отрицательным исходом программ ВРТ наиболее часто выявляется *Proteobacteria* с максимальной относительной представленностью.

7. Разработанная классификационная модель прогноза эффективности программ ВРТ у пациентов с НОА, основанная на выявлении ключевых дискриминантных таксонов *Leuconostoc falkenbergense*, *Ruminococcus E sp003438075*, *Bifidobacterium adolescentis*, *g__Staphylococcus*, *g__Rubellimicrobium*, *g__Bacillus_P_294101* и *s__Bacilli* в микробиоте ткани яичка, обеспечивает корректное прогнозирование положительных исходов ВРТ в 93,75% случаев (15 из 16 пациентов) и отрицательных исходов в 91,1% случаев (51 из 56 пациентов). Общая точность модели составила 91,9%. Применение разработанной модели, основанной на характеристиках микробиоты уретры, позволило достоверно предсказать 68,75% положительных результатов ВРТ (11 из 16 пациентов) и 98,2% отрицательных результатов (55 из 56 пациентов). Наиболее значимыми признаками в данной модели являются наличие представителей микробиоты *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Enterococcus faecalis*, *f__Neisseriaceae_563222*, *Bifidobacterium vaginale* и *Dialister invisus* и отсутствие *Dialister invisus* и *Bifidobacterium vaginale*. Общая точность модели составила 91,2%.

8. Концепция ведения пациентов с мужским фактором бесплодия должна быть основана:

- на современных представлениях о молекулярно-генетических, микробиологических, иммунологических, цитоморфологических характеристиках тестикулярной ткани пациентов, в частности сведений о ее таксономическом дизайне и патогенетической роли ТК СРАЗ-позитивных тучных клеток в ткани яичка в нарушениях сперматогенеза;
- на результатах оценки характеристик тестикулярного микробиома, основанных на получении биологического материала с использованием метода малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной

ткани у инфертильных мужчин, а также на основе результатов ПЦР-исследования с применением предложенного набора праймеров при оценке микробиома уретры и ткани яичка;

- на использовании моделей прогноза результатов применения программ ВРТ при нарушениях сперматогенеза различной этиологии;
- с учетом того, что микробиом тестикулярной ткани инфертильных мужчин имеет ограниченный спектр разнообразия таксонов не только по филам, но и по семейственной принадлежности микроорганизмов.

Интеграция описанной концепции в рутинную практику создаёт научную основу для внедрения персонализированных подходов в репродуктивной урологии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать разработанный метод малоинвазивного выделения бактериальной ДНК из биоптата тестикулярной ткани для повышения точности диагностики воспалительных изменений яичка и коррекции алгоритма ведения пациентов с мужским бесплодием.

2. Использование разработанной прецизионной технологии выделения бактериальной ДНК из ткани биоптата яичка является целесообразным при анализе микробиоты тестикулярной ткани и выборе тактики преодоления мужской infertility, в том числе прогноза эффективности участия пациентов в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

3. В случае выявления у пациента интенсивной инфильтрации интерстиция яичка триптазаактивными тучными клетками на уровне > 39 в 1 мм^2 тестикулярной ткани и при выявлении нарушений сперматогенеза на уровне 6 баллов и ниже рекомендуется проведение протокола ВРТ с донацией сперматозоидов. Чувствительность и специфичность метода составляет 95% и 100% соответственно.

4. Для повышения точности диагностики нарушений сперматогенеза и персонализации ведения мужчин с азооспермией рекомендуется применение предложенного набора праймеров для полимеразной цепной реакции при оценке микробиома уретры и ткани яичка.

5. Целесообразным является применение классифицирующих моделей на основе характеристик микробиоты ткани уретры и яичка (ключевых дискриминантных таксонов) для прогноза исходов программ ВРТ при участии в них мужчин с различными видами азооспермии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- БВ – бактериальный вагиноз
- ВЖД – высокожировая диета
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВПЧ – вирус папилломы человека
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ГТБ – гематотестикулярный барьер
- ГХМС – газовой хромато-масс-спектрометрии
- ДК – дендритные клетки
- ДЭГФ – диэтилгексилфталат
- ИГХ – иммуногистохимическое (исследование)
- ИДО – индоламин-2,3-диоксигеназа
- ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов
- ИЛ – интерлейкин
- иНОА – идиопатическая необструктивная азооспермия
- ИППП – инфекции, передаваемые половым путем
- КС – клетки Сертоли
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- НОА – необструктивная азооспермия
- ОА – обструктивная азооспермия
- ПЖ – предстательная железа
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- СП – секрет простаты
- ТК – тучные клетки
- ТФР – трансформирующий фактор роста
- ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
- ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХАП – хронический абактериальный простатит
ХБП – хронический бактериальный простатит
ХП/СХТБ – хронический простатит/ синдром хронической тазовой боли
ХП – хронический простатит
ЭД – эндокринные дизрапторы
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
ASV – варианты ампликонной последовательности
CPA3 – карбоксипептидаза 3
NGS (Next Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения
NOS – синтаза оксида азота
PacBio – компания Pacific Biosciences
SMS – одномолекулярное секвенирование одной молекулы
SMRT – одномолекулярная последовательность в реальном времени
SV – структурные вариации
TLR – toll-like receptors
Treg – регуляторные клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адьювантная антиоксидантная терапия у больных бесплодием при варикоцеле / С. И. Гамидов, Р. И. Овчинников, А. Ю. Попова [и соавт.] // Урология. – 2017. – № 2 (suppl.). – С. 64–72.
2. Ведение пациента с секреторной формой азооспермии / А. Д. Бушмакин, К. А. Луговой, Е. В. Помешкин [и соавт.] // Медицина в Кузбассе. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 115–121.
3. Ворошилина, Е. С. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом / Е. С. Ворошилина, Д. Л. Зорников, Е. А. Паначева // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1. – С. 44–49.
4. Вуйцик, П. А. Оценка репродуктивной функции мужчин и профилактика андрогенодефицита / П. А. Вуйцик // Медицина труда и промышленная экология. – 2020. – Т. 60, № 11. – С. 746–748.
5. Глуховец, Б. И. Анализ микробиоценоза репродуктивной системы методом хромато-масс-спектрометрии: практическое пособие / Б. И. Глуховец, А. Г. Ходарева. – СПб., 2016. – 61 с.
6. Годовалов, А. П. Микроэкологический подход к оценке особенностей микробиоты эякулята в профилактике снижения фертильности / А. П. Годовалов, Т. И. Карпунина // Профилактическая медицина. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 108–112.
7. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus spp.* в эякуляте / Д. Г. Почерников, Н. Т. Постовойтенко, В. В. Гетьман, И. С. Галкина // Вестник РГМУ. – 2020. – № 3. – С. 42–48.
8. Ибишев, Х. С. Иммунологические аспекты мужского бесплодия: обзор литературы 2016–2020 годов / Х. С. Ибишев, Э. А. Мамедов, Г. А. Магомедов // Вестник урологии. – 2020. – Т. 8, № 3. – С. 97–102.
9. Информативность биоматериала для исследования микробиоты

урогенитального тракта мужчин методом ПЦР РВ (пилотное исследование) / Д. Г. Почерников, Ю. Г. Витвицкая, М. Н. Болдырева, И. С. Галкина // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 2. – С. 128–133.

10. К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин / А. П. Годовалов, Н. В. Николаева, Т. И. Карпунина, Д. А. Оборин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99, № 4. – С. 428–435.

11. Коган, М. И. Микробиота секрета простаты: сравнительный анализ хронического простатита категорий II и IIIА / М. И. Коган, Ю. Л. Набока, Р. С. Исмаилов // Урология. – 2020. – № 2. – С. 16–22.

12. Костин, А. А. Применение динамической орхосцинтиграфии в диагностике и лечении идиопатического мужского бесплодия / А. А. Костин, Н. Г. Кульченко, А. Р. Алиев // Андрология и генитальная хирургия. – 2012. – Т. 13, № 4. – С. 29–32.

13. Кутукова, Н. А. Тучные клетки: роль в воспалении, восстановлении тканей и развитии фиброза / Н. А. Кутукова, П. Г. Назаров // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 11–20.

14. Локшин, К. Л. Простатит: что нового и полезного в фундаментальных и клинических исследованиях? / К. Л. Локшин // Вестник урологии. – 2017. – Т. 5, № 4. – С. 69–78.

15. Мадыкин, Ю. Ю. Програмные мероприятия по выявлению факторов риска состояния репродуктивного здоровья юношей-студентов в Воронежской области / Ю. Ю. Мадыкин, О. В. Золотухин, Н. В. Хороших [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2019. – Т. 22, № 2. – С. 4–8.

16. Микробиота органов уrogenитальной системы / З. А. Кадыров, В. С. Степанов, Э. М. Алдыраков, Ш. Г. Мошеинашвили // Урология. – 2021. – № 6. – С. 136–140.

17. Микробиота эякулята при азооспермии: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ / Е. А. Паначева, Д.

Л. Зорников, А. В. Иванов, Е. С. Ворошила // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: материалы VI Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов, посвященной Году науки и технологий. – Екатеринбург, 2021. – С. 1600–1604.

18. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ / Е. С. Ворошила, Д. Л. Зорников, А. В. Иванов [и соавт.] // Вестник РГМУ. – 2020. – № 5. – С. 66–73.

19. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы / Г. С. Лебедев, Н. А. Голубев, И. А. Шадеркин [и соавт.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 4–12.

20. Олефир, Ю. В. Клиническое значение варикоцелектонии: обзор литературы / Ю. В. Олефир, Е. А. Ефремов, М. А. Родионов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2023. – Т. 24, № 2. – С. 49–57.

21. Опыт организации трехуровневой медицинской помощи в сфере репродуктивного здоровья мужчин / И. А. Панченко, Н. К. Гришина, Э. С. Марабян [и соавт.] // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н. А. Семашко. – 2022. – № 4. – С. 15–18.

22. Осипов, Г. А. Количественный *in situ* микробиологический анализ по липидным маркерам в биологических жидкостях с использованием метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии / Г. А. Осипов, Н. Ф. Федосова, К. В. Лядов // Здравоохранение и медицинские технологии. – 2007. – № 5. – С. 20–23.

23. Осипов, Г. А. Микроэкология человека в норме и патологии по данным масс-спектрометрии микробных маркеров / Г. А. Осипов, Г. Г. Родионов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2013. – № 2. – С. 43–53.

24. Осипов, Г. А. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике / Г. А. Осипов, Г. Г. Родионов // Поликлиника. Спецвыпуск: Лаборатория ЛПУ. – 2013. – № 2. – С. 68–73.

25. Пограничные функциональные состояния мужской репродуктивной системы: влияние на здоровье и качество жизни / И. В. Бородачева, А. Г. Артеменко, Т. Г. Погодина [и соавт.] // Менеджер здравоохранения. – 2021. – № 9. – С. 55–63.
26. Поколения методов секвенирования ДНК / А. Г. Бородинов, В. В. Манойлов, И. В. Заруцкий [и соавт.] // Научное приборостроение. – 2020. – Т. 30, № 4. – С. 3–20.
27. Попова, А. Ю. Варикоцеле и необструктивная азооспермия – с чего начать? / А. Ю. Попова, С. И. Гамидов, Р. И. Овчинников [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2017. – Т. 18, № 4. – С. 77–80.
28. Почерников, Д. Г. Сравнительный анализ культурального и молекулярно-генетического методов в исследовании микробиоты эякулята при мужской инфертильности / Д. Г. Почерников, Н. Т. Постовойтенко, А. И. Стрельников // Андрология и генитальная хирургия. – 2019. – Т. 20, № 2. – С. 40–47.
29. Сравнительная оценка уровня ДНК-фрагментации и других показателей фертильности эякулята / С. Г. Жабин, Э. А. Трещенков, С. Б. Артифексов [и соавт.] // Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 121–124.
30. Сравнительный анализ микробиоты ткани яичка и уретры у пациентов с азооспермией методом секвенирования нового поколения (NGS) / М. В. Фаниев, Я. В. Прокопьев, К. В. Фаустова [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2024. – Т. 25, № 2. – С. 120–126.
31. Сравнительный анализ микробиоты уретры и яичек у пациентов с обструктивной азооспермией с результатами вспомогательных репродуктивных технологий / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Я. В. Прокопьев [и соавт.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2025. – Т. 18, № 3. – С. 88–97.
32. Структура микробиоты фертильных и инфертильных пациентов с различными видами азооспермии / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Н. К. Дружинина

[и соавт.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2024. – Т. 17, № 2. – С. 36–44.

33. Тестикулярный микробиом у инфертильных мужчин / З. А. Кадыров, М. В. Фаниев, Я. В. Прокопьев [и соавт.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2023. – Т. 16, № 3. – С. 81–86.

34. Тучные клетки в сочетании с обеднением микробиома яичка как фактор патогенеза необструктивного мужского бесплодия / Н. Г. Кульченко, М. В. Фаниев, З. А. Кадыров [и соавт.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2024. – Т. 17, № 3. – С. 94–99.

35. Тучные клетки и сперматогенез в норме и при повреждении / Ю. С. Храмцова, О. С. Арташян, Н. В. Тюменцева [и соавт.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 237–246.

36. Фаниев, М. В. Тестикулярный микробиом [Электронный ресурс]: монография / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Н. Г. Кульченко, Д. И. Водолажский, В. С. Степанов // Научные технологии. – 2026. – 180 с. – Режим доступа: <https://publishing.intelgr.com/archive/Testikulyarnii-mikrobiom.pdf>.

37. Функции, взаимодействия и роль микробиома в нарушении репродуктивного здоровья мужчин, обусловленного дисбиозом урогенитального тракта / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Я. В. Прокопьев, Н. А. Коваль // Вестник Медицинского института непрерывного образования. – 2025. – Т. 5, № 4. – С. 91–95.

38. Характеристика таксономической структуры микробиоты тестикул и уретры у мужчин с необструктивной азооспермией с различными исходами в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий / М. В. Фаниев, З. А. Кадыров, Н. К. Дружинина [и соавт.] // Урология. – 2025. – № 1. – С. 47–53.

39. Цуканов, А. Ю. Повышение результативности микробиологического исследования эякулята при диагностике причин мужского бесплодия / А. Ю. Цуканов, Д. О. Сатыбалдин, С. П. Семикина // Урология. – 2019. – № 6. – С. 26–30.

40. Чигринец, С. В. Связь микробиоты уретры с качеством эякулята и содержанием эндокринных дисрапторов в семенной жидкости у мужчин / С. В. Чигринец, Г. В. Брюхин // Андрология и генитальная хирургия. – 2018. – Т. 19, № 4. – С. 60–66.
41. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria / S. Chakravorty, D. Helb, M. Burday [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – Vol. 69, № 2. – P. 330–339.
42. Aafjes, J. H. Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia / J. H. Aafjes, J. C. van der Vijver, P. E. Schenck // British Medical Journal. – 1978. – Vol. 1. – P. 289–290.
43. Abdel-Latif, A. Correlation between testicular mast cell count and spermatogenic epithelium in non-obstructive azoospermia / A. Abdel-Latif // International Journal of Experimental Pathology. – 2018. – Vol. 99, № 1. – P. 22–28.
44. Aitken, R. J. The male is significantly implicated as the cause of unexplained infertility / R. J. Aitken // Seminars in Reproductive Medicine. – 2020. – Vol. 38. – P. 3–20.
45. Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis / Y. Zhao, P. Zhang, W. Ge [et al.] // Theranostics. – 2020. – Vol. 10, № 7. – P. 3308–3324.
46. Alkandari, M. H. Medical management of non-obstructive azoospermia: a systematic review / M. H. Alkandari, A. Zini // Arab Journal of Urology. – 2021. – Vol. 19, № 3. – P. 215–220.
47. Almeida, O. G. G. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology / O. G. G. Almeida, E. C. P. De Martinis // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103, № 1. – P. 69–82.
48. An overview of essential microelements and common metallic nanoparticles and their effects on male fertility / R. Maciejewski, E. Radzikowska-Büchner, W. Flieger [et al.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2022. – Vol. 19, № 17. – P. 11066.

49. Andrade, D. L. Differential diagnosis of azoospermia in men with infertility / D. L. Andrade, M. C. Viana, S. C. Esteves // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10, № 14. – P. 5–24.
50. Arshad, M. A. Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature / M. A. Arshad, A. Majzoub, S. C. Esteves // *International Urology and Nephrology*. – 2020. – Vol. 52, № 11. – P. 2015–2038.
51. Assessing the testicular sperm microbiome: a low-biomass site with abundant contamination / N. M. Molina, J. Plaza-Díaz, R. Vilchez-Vargas [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2021. – Vol. 43, № 3. – P. 523–531.
52. *Bacillus licheniformis* ameliorates aflatoxin B1-induced testicular damage by improving the gut-metabolism-testis axis / F. L. Zhang, H. H. Ma, P. Y. Dong [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2024. – Vol. 468. – P. 133836.
53. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality / S. L. Weng, C. M. Chiu, F. M. Lin [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – P. e110152.
54. Bacteriospermia and its impact on basic semen parameters among infertile men / S. Vilvanathan, B. Kandasamy, A. L. Jayachandran [et al.] // *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2614692.
55. Bhushan, S. The macrophages in testis function / S. Bhushan, A. Meinhardt // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2017. – Vol. 119. – P. 107–112.
56. Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice / M. Baptissart, A. Vega, E. Martinot [et al.] // *Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – P. 1054–1065.
57. Birnboim, H. C. Rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA / H. C. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Research*. – 1979. – Vol. 7. – P. 1513–1522.
58. Brandão, P. Seminal and testicular microbiome and male fertility: a

systematic review / P. Brandão, M. Gonçalves-Henriques, N. Ceschin // *Porto Biomedical Journal*. – 2021. – Vol. 6, № 6. – P. e151.

59. Brant, A. Modern surgical treatment of azoospermia / A. Brant, P. N. Schlegel // *Current Opinion in Urology*. – 2023. – Vol. 33, № 1. – P. 39–44.

60. Brennan, C. A. *Fusobacterium nucleatum* – symbiont, opportunist and oncobacterium / C. A. Brennan, W. S. Garrett // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Vol. 17, № 3. – P. 156–166.

61. Carboxypeptidase A3 – a key component of the protease phenotype of mast cells / D. Atiakshin, A. Kostin, I. Trotsenko [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 3. – P. 570.

62. Casas, R. The protective effects of extra virgin olive oil on immune-mediated inflammatory responses / R. Casas, R. Estruch, E. Sacanella // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. – 2018. – Vol. 18. – P. 23–35.

63. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts / M. Punab, O. Poolamets, P. Paju [et al.] // *Human Reproduction*. – 2017. – Vol. 32. – P. 18–31.

64. CD106 (VCAM-1) in testicular immunoregulation / S. Sainio-Pöllänen, J. Sundström, S. Erkkilä [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 1997. – Vol. 33. – P. 221–238.

65. Cell-based therapy approaches in treatment of non-obstructive azoospermia / E. Roshandel, M. Mehravar, M. Nikoonezhad [et al.] // *Reproductive Sciences*. – 2023. – Vol. 30, № 5. – P. 1482–1494.

66. Cellular therapy via spermatogonial stem cells for treating impaired spermatogenesis, non-obstructive azoospermia / N. E. Abdelaal, B. M. Tanga, M. Abdelgawad [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 1779.

67. Cellular therapy via spermatogonial stem cells for treating impaired spermatogenesis, non-obstructive azoospermia / N. E. Abdelaal, B. M. Tanga, M. Abdelgawad [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 1779.

68. Characterisation of macaque testicular leucocyte populations and T-

lymphocyte immunity / R. De Rose, C. S. Fernandez, M. P. Hedger [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2013. – Vol. 100. – P. 146–156.

69. Characteristics of gut microbiota in patients with asthenozoospermia: a Chinese pilot study / Y. Pan, S. Wang, L. Liu, X. Liu // *BMC Microbiology*. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 22.

70. Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria / C. Monteiro, P. I. Marques, B. Cavadas [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2018. – Vol. 79, № 6. – P. e12838.

71. Characterization of the micro-environment of the testis that shapes the phenotype and function of testicular macrophages / M. Wang, M. Fijak, H. Hossain [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 198. – P. 4327–4340.

72. Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: an update / J. P. Mackern-Oberti, R. D. Motrich, M. L. Breser [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2013. – Vol. 100. – P. 37–53.

73. Chronic alcohol-induced dysbiosis of the gut microbiota and gut metabolites impairs sperm quality in mice / H. Li, N. Li, Q. Lu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1042923.

74. Chronic prostatitis/chronic pain pelvic syndrome and male infertility / A. Graziani, G. Grande, M. Martin [et al.] // *Life*. – 2023. – Vol. 13, № 8. – P. 1700.

75. Chronodisruption by chronic jetlag impacts metabolic and gastrointestinal homeostasis in male mice / L. Desmet, T. Thijs, A. Segers [et al.] // *Acta Physiologica*. – 2021. – Vol. 233. – P. e13703.

76. Correlation between testicular mast cell count and spermatogenic epithelium in non-obstructive azoospermia / A. A. M. Abdel-Hamid, H. Atef, K. R. Zalata, A. Abdel-Latif // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2018. – Vol. 99, № 1. – P. 22–28.

77. Cortical bone adaptation to a moderate level of mechanical loading in male

Sost deficient mice / H. Yang, A. Büttner, L. Albiol [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – P. 22299.

78. Crosstalk between body microbiota and the regulation of immunity / C. Rojas, F. Gálvez-Jirón, J. De Solminihaç [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 6274265.

79. Current knowledge about the connection between health status and gut microbiota from birth to elderly. A narrative review / L. Santacrose, A. Man, I. A. Charitos [et al.] // *Frontiers in Bioscience*. – 2021. – Vol. 26. – P. 135–148.

80. Cyto- and histopographic assessment of CPA3-positive testicular mast cells in obstructive and non-obstructive azoospermia / D. Atiakshin, N. Kulchenko, A. Kostin [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol. 13, № 10. – P. 833.

81. Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: immunoregulation and beyond / K. L. Loveland, B. Klein, D. Poeschl [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 307.

82. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen [et al.] // *Nature Methods*. – 2016. – Vol. 13, № 7. – P. 581–583.

83. Determination of the upper reference limit of human epididymis secretory protein 4 (HE4) in healthy male individuals and correlation with renal and fertility markers / A. Schirinzi, A. P. Cazzolla, R. Lovero [et al.] // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. – 2021. – Vol. 21. – P. 912–918.

84. Differential composition of vaginal microbiome, but not of seminal microbiome, is associated with successful intrauterine insemination in couples with idiopathic infertility: a prospective observational study / V. Amato, E. Papaleo, R. Pasciuta [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 7, № 1. – P. ofz525.

85. Differential immune response to infection and acute inflammation along the epididymis / C. Pleuger, E. J. R. Silva, A. Pilatz [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 599594.

86. Does hormonal therapy improve sperm retrieval rates in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis / T. Tharakan, G. Corona, D. Foran [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2022. – Vol. 28, № 5. – P. 609–628.
87. Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial / T. A. Abdel-Meguid, A. Al-Sayyad, A. Tayib, H. M. Farsi // *European Urology*. – 2011. – Vol. 59, № 3. – P. 455–461.
88. EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 update on male infertility / S. Minhas, C. Bettocchi, L. Boeri [et al.] // *European Urology*. – 2021. – Vol. 80, № 5. – P. 603–620.
89. Effect of environmental factors on seminal microbiome and impact on sperm quality / F. T. L. Neto, M. C. Viana, F. Cariati [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1348186.
90. Effect of folic acid and zinc supplementation in men on semen quality and live birth among couples undergoing infertility treatment: a randomized clinical trial / E. F. Schisterman, L. A. Sjaarda, T. Clemons [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – P. 35–48.
91. Effect of microbiota on the physiology of blood-tissue barriers / N. García-Esquivel, L. González-López, I. P. Vega-Campos [et al.] // *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. – 2020. – Vol. 58, № 4. – P. 486–493.
92. Effect of surgical repair on testosterone production in infertile men with varicocele: a meta-analysis / F. Li, H. Yue, K. Yamaguchi [et al.] // *International Journal of Urology*. – 2012. – Vol. 19, № 2. – P. 149–154.
93. Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability / A. Barbonetti, B. Cinque, M. R. Vassallo [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95, № 8. – P. 2485–2488.
94. Effects of varicocele on serum testosterone and changes of testosterone after varicolectomy: a prospective controlled study / T. A. Abdel-Meguid,

- H. M. Farsi, A. Al-Sayyad [et al.] // *Urology*. – 2014. – Vol. 84, № 5. – P. 1081–1087.
95. Effects of varicocele repair on spontaneous first trimester miscarriage: a randomized clinical trial / M. Mansour Ghanaie, S. A. Asgari, N. Dadrass [et al.] // *Urology Journal*. – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 505–513.
96. Elieh Ali Komi, D. Significance of mast cells in spermatogenesis, implantation, pregnancy, and abortion: cross talk and molecular mechanisms / D. Elieh Ali Komi, F. Shafaghat, G. Haidl // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2020. – Vol. 83, № 5. – P. e13228.
97. Elieh Ali Komi, D. The emerging role of mast cells in skin cancers: involved cellular and molecular mechanisms / D. Elieh Ali Komi, A. Jalili // *International Journal of Dermatology*. – 2022. – Vol. 61, № 7. – P. 792–803.
98. Endometrial microbiota profile in in vitro fertilization (IVF) patients by culturomics-based analysis / F. Cariati, C. Carotenuto, F. Bagnulo [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. – Vol. 14. – P. e1204729.
99. Environmental factors in declining human fertility / N. E. Skakkebaek, R. Lindahl-Jacobsen, H. Levine [et al.] // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2022. – Vol. 18, № 3. – P. 139–157.
100. Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries / A. Stammeler, T. Hau, S. Bhushan [et al.] // *Human Reproduction*. – 2015. – Vol. 30. – P. 1557–1565.
101. *Escherichia coli*, a common constituent of benign prostate hyperplasia-associated microbiota, induces inflammation and DNA damage in prostate epithelial cells / S. Jain, A. G. Samal, B. Das [et al.] // *Prostate*. – 2020. – Vol. 80, № 15. – P. 1341–1352.
102. Esteves, S. C. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men / S. C. Esteves, D. Santi, M. Simoni // *Andrology*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 53–81.
103. Esteves, S. C. Evolution of the World Health Organization semen analysis manual: where are we? / S. C. Esteves // *Nature Reviews Urology*. – 2022. – Vol. 19,

№ 7. – P. 439–446.

104. Esteves, S. C. Towards infertility care on equal terms: a prime time for male infertility / S. C. Esteves, P. Humaidan // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2023. – Vol. 17, № 1. – P. 11–24.

105. Esteves, S. C. Who cares about oligozoospermia when we have ICSI / S. C. Esteves // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2022. – Vol. 44, № 5. – P. 769–775.

106. Ethylene dimethane sulfonate (EDS) ablation of Leydig cells in adult rat depletes testosterone resulting in epididymal sperm granuloma: testosterone replacement prevents granuloma formation / D. Dutta, I. Park, H. Guililat [et al.] // *Reproductive Biology*. – 2019. – Vol. 19. – P. 89–99.

107. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele / R. A. Saleh, A. Agarwal, R. K. Sharma [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2003. – Vol. 80, № 6. – P. 1431–1436.

108. Evaluation of the inhibitory effects of vaginal microorganisms on sperm motility in vitro / H. Wang, T. Chen, Y. Chen [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 535–544.

109. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years / E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N. E. Skakkebaek // *BMJ*. – 1992. – Vol. 305, № 6854. – P. 609–613.

110. Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women / S. Hawkesworth, S. E. Moore, A. J. Fulford [et al.] // *Nutrition & Diabetes*. – 2013. – Vol. 3. – P. e83.

111. Exosome-mediated uptake of mast cell tryptase into the nucleus of melanoma cells: a novel axis for regulating tumor cell proliferation and gene expression / F. Rabelo Melo, S. Santosh Martin, C. P. Sommerhoff, G. Pejler // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – P. 659.

112. Exploring natural product activity and species source candidates for hunting ABCB1 transporter inhibitors: an in silico drug discovery study /

M. A. Ibrahim, K. A. Abdeljawaad, A. H. Abdelrahman [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – P. 3104.

113. Exploring the potential impact of human papillomavirus on infertility and assisted reproductive technology outcomes / L. Tramontano, R. Sciorio, S. Bellaminutti [et al.] // *Reproductive Biology*. – 2023. – Vol. 23, № 2. – P. 100753.

114. Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development / W. H. Pan, F. Sommer, M. Falk-Paulsen [et al.] // *Genome Medicine*. – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 27.

115. Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomes spanning age, geography and lifestyle / E. Pasolli, F. Asnicar, S. Manara [et al.] // *Cell*. – 2019. – Vol. 176, № 3. – P. 649–662.

116. Fainberg, J. Recent advances in understanding and managing male infertility / J. Fainberg, J. A. Kashanian // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – F1000 Faculty Rev-670.

117. Feng, T. Microorganisms in the reproductive system and probiotic's regulatory effects on reproductive health / T. Feng, Y. Liu // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2022. – Vol. 20. – P. 1541–1553.

118. Ferramosca, A. Diet and male fertility: the impact of nutrients and antioxidants on sperm energetic metabolism / A. Ferramosca, V. Zara // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – P. 2542.

119. Functional and taxonomic dysbiosis of the gut, urine, and semen microbiomes in male infertility / S. D. Lundy, N. Sangwan, N. V. Parekh [et al.] // *European Urology*. – 2021. – Vol. 79, № 6. – P. 826–836.

120. Future needs in mast cell biology / G. Varricchi, A. de Paulis, G. Marone, S. J. Galli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 18. – P. 4397.

121. FXR in the dorsal vagal complex is sufficient and necessary for upper small intestinal microbiome-mediated changes of TCDCA to alter insulin action in rats /

- S. Y. Zhang, R. J. W. Li, Y. M. Lim [et al.] // *Gut*. – 2021. – Vol. 70. – P. 1675–1683.
122. Gender medicine: the impact of probiotics on male patients / L. Pacifici, L. Santacroce, G. Dipalma [et al.] // *La Clinica Terapeutica*. – 2021. – Vol. 171. – P. 8–15.
123. Genomic sequencing reveals the diversity of seminal bacteria and relationships to reproductive potential in boar sperm / J. Zhang, H. Liu, Q. Yang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1873.
124. Glyphosate-induced gut microbiota dysbiosis facilitates male reproductive toxicity in rats / J. B. Liu, K. Chen, Z. F. Li [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 805. – P. 150368.
125. Goyal, S. P. An insight into the critical role of gut microbiota in triggering the phthalate-induced toxicity and its mitigation using probiotics / S. P. Goyal, C. Saravanan // *Science of the Total Environment*. – 2023. – Vol. 904. – P. 166889.
126. Gray, J. I. Tissue-resident immune cells in humans / J. I. Gray, D. L. Farber // *Annual Review of Immunology*. – 2022. – Vol. 40. – P. 195–220.
127. Gu, X. Immune and vascular contributions to organogenesis of the testis and ovary / X. Gu, S. Y. Li, T. De Falco // *FEBS Journal*. – 2022. – Vol. 289, № 9. – P. 2386–2408.
128. Guasch-Ferré, M. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview / M. Guasch-Ferré, W. C. Willett // *Journal of Internal Medicine*. – 2021. – Vol. 290. – P. 549–566.
129. Guiton, R. The immunobiology of the mammalian epididymis: the black box is now open! / R. Guiton, J. Henry-Berger, J. R. Drevet // *Basic and Clinical Andrology*. – 2013. – Vol. 23. – P. 8.
130. Gut microbiota combined with metabolome dissects long-term nanoplastics exposure-induced disturbed spermatogenesis / Y. Zhou, X. Zhong, L. Chen [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2023. – Vol. 267. – P. 115626.
131. Gut microbiota is involved in male reproductive function: a review / S. Lv, J. Huang, Y. Luo [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Vol. 15. –

P. 1371667.

132. Gut microbiota supports male reproduction via nutrition, immunity, and signaling / H. Cai, X. Cao, D. Qin [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 977574.

133. Gut microbiota-testis axis: FMT improves systemic and testicular micro-environment to increase semen quality in type 1 diabetes / Y. Hao, Y. Feng, X. Yan [et al.] // *Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 28, № 1. – P. 45.

134. Gut microbiota-testis axis: FMT mitigates high-fat diet-diminished male fertility via improving systemic and testicular metabolome / Y. Hao, Y. Feng, X. Yan [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. e0002822.

135. Gut-derived exosomes mediate the microbiota dysbiosis-induced spermatogenesis impairment by targeting Meioc in mice / T. Chen, B. Zhang, G. He [et al.] // *Advanced Science*. – 2024. – Vol. 11, № 22. – P. e2310110.

136. Gut-testis axis: microbiota prime metabolome to increase sperm quality in young type 2 diabetes / X. Yan, Y. Feng, Y. Hao [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10, № 5. – P. e0142322.

137. Hallak, J. Concise practice recommendations for the provision of andrological services and assisted reproductive technology for male infertility patients during the SARS-CoV-2 in Brazil / J. Hallak, S. C. Esteves // *International Brazilian Journal of Urology*. – 2020. – Vol. 46, № 6. – P. 1082–1089.

138. Heat stress-induced dysbiosis of the gut microbiota impairs spermatogenesis by regulating secondary bile acid metabolism in the gut / G. He, B. Zhang, K. Yi [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 937. – P. 173305.

139. Hedger, M. P. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis / M. P. Hedger // *Journal of Andrology*. – 2011. – Vol. 32. – P. 625–640.

140. Hematogenous dissemination of *Chlamydia muridarum* from the urethra in macrophages causes testicular infection and sperm DNA damage / E. R. Bryan,

A. Kollipara, L. K. Trim [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2019. – Vol. 101. – P. 748–759.

141. Histological changes of the testicular interstitium during postnatal development in microminipigs / A. Kangawa, M. Otake, S. Enya [et al.] // *Toxicologic Pathology*. – 2019. – Vol. 47, № 4. – P. 469–482.

142. House feeding pattern increased male yak fertility by improving gut microbiota and serum metabolites / Y. Zhu, X. Li, Lousang-Zhaxi Suolang-Zhaxi [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 9. – P. 989908.

143. HPV infection and bacterial microbiota in the semen from healthy men / H. Tuominen, J. Rautava, K. Kero [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 373.

144. Human male genital tract microbiota / A. Zuber, A. Peric, N. Pluchino [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 8. – P. 6939.

145. Identification and validation of CCL2 as a potential biomarker relevant to mast cell infiltration in the testicular immune microenvironment of spermatogenic dysfunction / F. Dong, P. Ping, S. Q. Wang [et al.] // *Cell & Bioscience*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 94.

146. Identification of COVID-19 and Dengue host factor interaction networks based on integrative bioinformatics analyses / W. Zheng, H. Wu, C. Liu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 707287.

147. Immune cell subtypes and their function in the testis / S. Bhushan, M. S. Theas, V. A. Guazzone [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. e583304.

148. Immune cells as critical regulators of steroidogenesis in the testis and beyond / X. Gu, S. Y. Li, S. Matsuyama, T. DeFalco // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 894437.

149. Immunology of COVID-19: current state of the science / N. Vabret, G. J. Britton, C. Gruber [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – P. 910–941.

150. Impact of asymptomatic genital tract infections on in vitro fertilization

(IVF) outcome / S. Ricci, S. De Giorgi, E. Lazzeri [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, № 11. – P. e0207684.

151. Impact of inflammation on male fertility / O. Sarkar, J. Bahrainwala, S. Chandrasekaran [et al.] // *Frontiers in Bioscience*. – 2011. – Vol. 3. – P. 89–95.

152. Impact of sexual debut on culturable human seminal microbiota / R. Mändar, S. Türk, P. Korrovits [et al.] // *Andrology*. – 2018. – Vol. 6. – P. 510–512.

153. Impacts of immunometabolism on male reproduction / L. Ye, W. Huang, S. Liu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 658432.

154. Impaired testicular signaling of vitamin A and vitamin K contributes to the aberrant composition of the extracellular matrix in idiopathic germ cell aplasia / M. Alfano, F. Pederzoli, I. Locatelli [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2019. – Vol. 111. – P. 687–698.

155. Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes / N. Ding, X. Zhang, X. D. Zhang [et al.] // *Gut*. – 2020. – Vol. 69. – P. 1608–1619.

156. Implications of prostate inflammation on male fertility / R. D. Motrich, F. C. Salazar, M. L. Breser [et al.] // *Andrologia*. – 2018. – Vol. 50, № 11. – P. e13093.

157. Improvement in sperm quality and spermatogenesis following faecal microbiota transplantation from alginate oligosaccharide dosed mice / P. Zhang, Y. Feng, L. Li [et al.] // *Gut*. – 2021. – Vol. 70, № 1. – P. 222–225.

158. Indoles from commensal bacteria extend healthspan / R. Sonowal, A. Swimm, A. Sahoo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol. 114. – P. 7506–7515.

159. Induction of spermatogenesis in men with azoospermia or severe oligoteratoasthenospermia after antegrade internal spermatic vein sclerotherapy for the treatment of varicocele / V. Poulakis, N. Ferakis, R. de Vries [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2006. – Vol. 8, № 5. – P. 613–619.

160. Infectious, inflammatory and ‘autoimmune’ male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? / M. Fijak, E. Schneider, J. Klug [et al.] //

Human Reproduction Update. – 2018. – Vol. 24. – P. 416–441.

161. Inflammatory cytokines may mediate the causal relationship between gut microbiota and male infertility: a bidirectional, mediating, multivariate Mendelian randomization study / H. Zou, N. Xu, H. Xu [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1368334.

162. Inhibition of inosine metabolism of the gut microbiota decreases testosterone secretion in the testis / L. Tang, X. Yang, M. Zhou [et al.] // *mSystems*. – 2024. – Vol. 9, № 4. – P. e0013824.

163. Inhibition of IP3R/Ca²⁺ dysregulation protects mice from ventilator-induced lung injury via endoplasmic reticulum and mitochondrial pathways / L. Ye, Q. Zeng, M. Ling [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 729094.

164. Integrative bioinformatics analysis to identify novel biomarkers associated with non-obstructive azoospermia / Y. Zhong, J. Zhao, H. Deng [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1088261.

165. Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases / M. Candelli, L. Franza, G. Pignataro [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 12. – P. 6242.

166. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism / A. Visconti, C. I. Le Roy, F. Rosa [et al.] // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 4505.

167. Intestinal microbiota defines the GUT-TESTIS axis / E. Martinot, L. Thirouard, H. Holota [et al.] // *Gut*. – 2022. – Vol. 71, № 4. – P. 844–845.

168. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring / S. C. Esteves, M. Roque, G. Bedoschi [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2018. – Vol. 15, № 9. – P. 535–562.

169. Is a nonbacterial prostatitis nonbacterial? / A. V. Strockij, A. A. Gavrushev, L. V. Rubanik, N. N. Poleshchuk // *Urology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 102–106.

170. Kim, D. S. Urinary tract infection and microbiome / D. S. Kim, J. W. Lee // *Diagnostics*. – 2023. – Vol. 13, № 11. – P. 1921.

171. Kırış, M. The effect of microsurgical varicocelelectomy on semen parameters in men with non-obstructive azoospermia / M. Kırış, N. Deniz, H. Biri // *Current Urology*. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 136–140.

172. Komi, D. E. A. A review of the contribution of mast cells in wound healing: involved molecular and cellular mechanisms / D. E. A. Komi, K. Khomtchouk, P. L. Santa Maria // *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. – 2020. – Vol. 58, № 3. – P. 298–312.

173. Kyrgiafini, M. A. Male infertility: from genes to genomes 2022 / M. A. Kyrgiafini, Z. Mamuris // *Genes*. – 2023. – Vol. 14, № 5. – P. 959.

174. *Lactobacillus iners* and *gasseri*, *Prevotella bivia* and HPV belong to the microbiological signature negatively affecting human reproduction / G. Campisciano, V. Iebba, G. Zito [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 39.

175. *Lactobacillus plantarum* TW1-1 alleviates diethylhexylphthalate-induced testicular damage in mice by modulating gut microbiota and decreasing inflammation / X. Tian, Z. Yu, P. Feng [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 221.

176. *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model / F. Dardmeh, H. Alipour, P. Gazerani [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0185964.

177. Localization and potential role of prostate microbiota / K. Okada, K. Takezawa, G. Tsujimura [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 1048319.

178. Lundy, S. D. Reply to Eugenio Ventimiglia, Edoardo Pozzi, Massimo Alfano, Francesco Montorsi, and Andrea Salonia's Letter to the Editor "Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility" / S. D. Lundy, S. C. Vij, C. Eng // *European Urology*. – 2021. – Vol. 79. – P. 826–836.

179. Male fertility as a marker for health / T. Chen, F. Belladelli, F. Del Giudice, M. L. Eisenberg // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2022. – Vol. 44,

№ 1. – P. 131–144.

180. Male infertility and gonadotropin treatment: what can we learn from real-world data? / S. C. Esteves, A. P. Achermann, M. Simoni [et al.] // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2023. – Vol. 86. – P. 102310.

181. Male infertility and somatic health – insights into lipid damage as a mechanistic link / N. D. Burke, B. Nixon, S. D. Roman [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2022. – Vol. 19, № 12. – P. 727–750.

182. Male infertility due to testicular disorders / A. Sharma, S. Minhas, W. S. Dhillon, C. N. Jayasena // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2021. – Vol. 106, № 2. – P. 442–459.

183. Male infertility in humans: an update on non-obstructive azoospermia (NOA) and obstructive azoospermia (OA) / X. Wu, D. Lin, F. Sun, C. Y. Cheng // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2021. – Vol. 1288. – P. 161–173.

184. Male infertility is a women's health issue – research and clinical evaluation of male infertility is needed / K. A. Turner, A. Rambhatla, S. Schon [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 990. 305

185. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens / F. Gimenes, R. P. Souza, J. C. Bento [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2014. – Vol. 11, № 12. – P. 672–687.

186. Male obesity: associated effects on fertility and the outcomes of offspring / G. Venigalla, V. Ila, J. Dornbush [et al.] // *Andrology*. – 2025. – Vol. 13, № 1. – P. 64–71.

187. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility / A. Agarwal, N. Parekh, M. K. Panner Selvam [et al.] // *World Journal of Men's Health*. – 2019. – Vol. 37. – P. 296–312.

188. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility / N. E. Skakkebaek, E. Rajpert-De Meyts, G. M. Buck Louis [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2016. – Vol. 96, № 1. – P. 55–97.

189. Management of male factor infertility: position statement from the Italian Society of Andrology and Sexual Medicine (SIAMS): endorsing organization: Italian Society of Embryology, Reproduction, and Research (SIERR) / A. Ferlin, A. Calogero, C. Krausz [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. – 2022. – Vol. 45, № 5. – P. 1085–1113.
190. Mast cell and basophil granule proteases – in vivo targets and function / L. Hellman, S. Akula, Z. Fu, S. Wernersson // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 918305.
191. Mast cell beta-tryptase is enzymatically stabilized by DNA / S. Alanazi, M. Grujic, M. Lampinen [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. e5065.
192. Mast cell: an emerging partner in immune interaction / G. Gri, B. Frossi, F. D’Inca [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 120.
193. Mast cells as a potential target of molecular hydrogen in regulating the local tissue microenvironment / D. Atiakshin, A. Kostin, A. Volodkin [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16, № 6. – P. 817.
194. Matthews, G. J. Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia / G. J. Matthews, E. D. Matthews, M. Goldstein // *Fertility and Sterility*. – 1998. – Vol. 70, № 1. – P. 71–75.
195. Mechanisms of male reproductive sterility triggered by dysbiosis of intestinal microorganisms / M. Wei, H. Liu, Y. Wang [et al.] // *Life*. – 2024. – Vol. 14, № 6. – P. 694.
196. Meinhardt, A. Testicular macrophages: development and function in health and disease / A. Meinhardt, N. Dejuq-Rainsford, S. Bhushan // *Trends in Immunology*. – 2022. – Vol. 43. – P. 51–62.
197. Metabolic regulation is important for spermatogenesis / L. Rato, M. G. Alves, S. Socorro [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2012. – Vol. 9. – P. 330–338.

198. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of human prostate microbiota from patients with prostate cancer / Y. Feng, V. R. Ramnarine, R. Bell [et al.] // *BMC Genomics*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 146.

199. Metagenomics reveals specific microbial features in males with semen alterations / I. Veneruso, F. Cariati, C. Alviggi [et al.] // *Genes*. – 2023. – Vol. 14, № 6. – P. 1228.

200. Microbiological evaluation and sperm DNA fragmentation in semen samples of patients undergoing fertility investigation / C. Pagliuca, F. Cariati, F. Bagnulo [et al.] // *Genes*. – 2021. – Vol. 12, № 5. – P. 654.

201. Microbiome compositions from infertile couples seeking in vitro fertilization, using 16S rRNA gene sequencing methods: any correlation to clinical outcomes? / S. I. Okwelogu, J. I. Ikechebelu, N. R. Agbakoba, K. C. Anukam // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 709372.

202. Microbiota and human reproduction: the case of male infertility / R. Tomaiuolo, I. Veneruso, F. Cariati, V. D'Argenio // *High-Throughput*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 10–12.

203. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men / D. Hou, X. Zhou, X. Zhong [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2013. – Vol. 100. – P. 1261–1269.

204. Microbiota potential for the treatment of sexual dysfunction / H. Tirandaz, M. B. Ebrahim-Habibi, B. Moradveisi [et al.] // *Medical Hypotheses*. – 2018. – Vol. 115. – P. 46–49.

205. Microbiota-dependent expansion of testicular IL-17-producing V γ 6+ γ δ T cells upon puberty promotes local tissue immune surveillance / A. Demera, L. Hoenicke, T. Strowig [et al.] // *Mucosal Immunology*. – 2021. – Vol. 14. – P. 242–252.

206. Microenvironmental signals govern the cellular identity of testicular macrophages / A. Meinhardt, M. Wang, C. Schulz, S. Bhushan // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2018. – Vol. 104. – P. 757–766.

207. Microplastics-perturbed gut microbiota triggered the testicular disorder in

male mice: via fecal microbiota transplantation / S. Wen, Y. Zhao, S. Liu [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2022. – Vol. 309. – P. 119789.

208. microRNAs in the pathogenesis of non-obstructive azoospermia: the underlying mechanisms and therapeutic potentials / Y. Rastgar Rezaei, R. Zarezadeh, S. Nikanfar [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2021. – Vol. 67, № 5. – P. 337–353.

209. Mital, P. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions / P. Mital, B. T. Hinton, J. M. Dufour // *Biology of Reproduction*. – 2011. – Vol. 84. – P. 851–858.

210. Mixed probiotics modulated gut microbiota to improve spermatogenesis in bisphenol A-exposed male mice / J. Wu, T. Zhou, H. Shen [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024. – Vol. 270. – P. 115922.

211. Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and other sexually transmitted bacteria in semen of male partners of infertile couples in Tunisia: the effect on semen parameters and spermatozoa apoptosis markers / H. Sellami, A. Znazen, A. Sellami [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. e98903.

212. Molecular mechanisms of cellular dysfunction in testes from men with non-obstructive azoospermia / A. Piechka, S. Sparanese, L. Witherspoon [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2024. – Vol. 21, № 2. – P. 67–90.

213. Monsivais, D. The TGF- β family in the reproductive tract / D. Monsivais, M. M. Matzuk, S. A. Pangas // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2017. – Vol. 9. – P. ea022251.

214. Morielli, T. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa / T. Morielli, C. O'Flaherty // *Reproduction*. – 2015. – Vol. 149. – P. 113–123.

215. Multi-centre assessment of nitroblue tetrazolium reactivity in human semen as a potential marker of oxidative stress / J. Gosálvez, L. Coppola, J. L. Fernández [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2017. – Vol. 34, № 5. – P. 513–521.

216. Multidisciplinary approach to prostatitis / V. Magri, M. Boltri, T. Cai [et

- al.] // *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. – 2019. – Vol. 90, № 4. – P. 227–248.
217. Myandina, G. I. Polymorphism G-105A SEPS1 gene and men's infertility / G. I. Myandina, N. G. Kulchenko, H. Alhejoj // *Medical News of North Caucasus*. – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. 488–490.
218. Myandina, G. I. The frequency of polymorphism –262 C>T CAT gene of infertile men in the Moscow region / G. I. Myandina, N. G. Kulchenko, H. Alhejoj // *Medical News of North Caucasus*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 478–481.
219. New insights in laboratory testing for COVID-19 patients: looking for the role and predictive value of human epididymis secretory protein 4 (HE4) and the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract / A. Schirinzi, A. P. Cazzolla, R. Lovero [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1718.
220. New perspectives on the nutritional factors influencing growth rate of *Candida albicans* in diabetics. An in vitro study / A. Man, C. N. Ciurea, D. Pasaroiu [et al.] // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2017. – Vol. 112. – P. 587–592.
221. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome / C. R. Wensel, J. L. Pluznick, S. L. Salzberg, C. L. Sears // *Journal of Clinical Investigation*. – 2022. – Vol. 132, № 7. – P. e154944.
222. Nickel, J. C. Is chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome an infectious disease of the prostate? / J. C. Nickel // *Investigative and Clinical Urology*. – 2017. – Vol. 58. – P. 149–151.
223. Nobs, S. P. Nutrition regulates innate immunity in health and disease / S. P. Nobs, N. Zmora, E. Elinav // *Annual Review of Nutrition*. – 2020. – Vol. 40. – P. 189–219.
224. O'Connell, M. P. Resolving the genetics of human tryptases: implications for health, disease, and clinical use as a biomarker / M. P. O'Connell, J. J. Lyons // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. – 2022. – Vol. 22. – P. 143–152.
225. O'Donnell, L. Sperm-specific proteins: new implications for diagnostic development and cancer immunotherapy / L. O'Donnell, L. B. Smith, D. Rebourcet // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2022. – Vol. 77. – P. 102104.

226. Observational cross-sectional study on Mediterranean diet and sperm parameters / G. C. Petre, F. Francini-Pesenti, A. Di Nisio [et al.] // *Nutrients*. – 2023. – Vol. 15, № 23. – P. 4989.

227. O'Hanlon, D. E. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration / D. E. O'Hanlon, R. A. Come, T. R. Moench // *BMC Microbiology*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 13.

228. Olive Oil Extracts and Oleic Acid Attenuate the LPS-Induced Inflammatory Response in Murine RAW264.7 Macrophages but Induce the Release of Prostaglandin E2 / A. K. Müller, F. Albrecht, C. Rohrer [et al.] // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13. – P. 4437.

229. Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male reproduction / S. Dutta, P. Sengupta, P. Slama, S. Roychoudhury // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – P. 10043.

230. Pathological findings in the testes of COVID-19 patients: clinical implications / M. Yang, S. Chen, B. Huang [et al.] // *European Urology Focus*. – 2020. – Vol. 6. – P. 1124–1129.

231. Possible implications of bacteriospermia on the sperm quality, oxidative characteristics, and seminal cytokine network in normozoospermic men / E. Tvrdá, D. Lovíšek, E. Gálová [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 15. – P. 8678.

232. Potential beneficial role of probiotics on the outcome of COVID-19 patients: an evolving perspective / L. Santacroce, F. Inchingolo, S. Topi [et al.] // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. – 2021. – Vol. 15. – P. 295–301.

233. Potential pathogenic bacteria in seminal microbiota of patients with different types of dysspermatism / H. Yang, J. Zhang, Z. Xue [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 6876.

234. Prebiotics mannan-oligosaccharides accelerate sexual maturity in rats: a randomized preclinical study / L. E. Rodrigues, M. M. Kishibe, R. Keller [et al.] //

Veterinary World. – 2021. – Vol. 14. – P. 1210–1219.

235. Predictors of improved seminal parameters and fertility after varicocele repair in young adults / M. Rodriguez Peña, L. Alescio, A. Russell [et al.] // *Andrologia*. – 2009. – Vol. 41, № 5. – P. 277–281.

236. Predictors of testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia: a review / L. Qi, Y. P. Liu, N. N. Zhang, Y. C. Su // *Journal of International Medical Research*. – 2021. – Vol. 49, № 4. – P. e3000605211002703.

237. Pregnancy after varicocelectomy: impact of postoperative motility and DFI / K. Baker, J. McGill, R. Sharma [et al.] // *Urology*. – 2013. – Vol. 81, № 4. – P. 760–766.

238. Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh / A. H. Baqui, A. C. Lee, A. K. Koffi [et al.] // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2019. – Vol. 98, № 3. – P. 309–319.

239. Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors / D. G. Valcarce, S. Genovés, M. F. Riesco [et al.] // *Beneficial Microbes*. – 2017. – Vol. 8. – P. 193–206.

240. Probiotic intervention as a potential therapeutic for managing gestational disorders and improving pregnancy outcomes / A. Abbasi, A. Aghebati-Maleki, M. Yousefi, L. Aghebati-Maleki // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2021. – Vol. 143. – P. 103244.

241. Proctor, L. Priorities for the next 10 years of human microbiome research / L. Proctor // *Nature*. – 2019. – Vol. 569. – P. 623–625.

242. QuPath: open source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, M. B. Loughrey, J. A. Fernández [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. e16878.

243. Ranawat, P. A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction / P. Ranawat, C. M. Pathak, K. L. Khanduja // *Phytotherapy Research*. – 2013. – Vol. 27. – P. 802–810.

244. Rando, O. J. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism / O. J. Rando, R. A. Simmons // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, № 1. – P. 93–105.

245. Recent advances on the anti-inflammatory and antioxidant properties of red grape polyphenols: in vitro and in vivo studies / T. Magrone, M. Magrone, M. A. Russo, E. Jirillo // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 9. – P. 35.

246. Rehman, I. Lifestyle, environment, and male reproductive health: a lesson to learn / I. Rehman, G. Ahmad, S. Alshahrani // *Bioenvironmental issues affecting men's reproductive and sexual health* / ed. by S. Sikka, W. Hellstrom. – Academic Press, 2017. – P. 157–171.

247. Relationship between mast cell and iNOS expression in testicular tissue associated with infertility / C. Sezer, I. T. Koksall, M. F. Usta [et al.] // *Archives of Andrology*. – 2005. – Vol. 51, № 2. – P. 149–158.

248. Relationships between bacteriospermia, DNA integrity, nuclear protamine alteration, sperm quality and ICSI outcome / A. Zeyad, M. Hamad, H. Amor, M. E. Hammadeh // *Reproductive Biology*. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 115–121.

249. Reliability of the sperm chromatin dispersion assay to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with infertility / S. C. Esteves, C. López-Fernández, M. G. Martínez [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2022. – Vol. 117, № 1. – P. 64–73.

250. Remodeling of gut microbiota by probiotics alleviated heat stroke-induced necroptosis in male germ cells / H. Cai, D. Qin, Y. Liu [et al.] // *Molecular Nutrition & Food Research*. – 2023. – Vol. 67, № 18. – P. e2300291.

251. Responses of mast cells to pathogens: beneficial and detrimental roles / M. Jiménez, D. Cervantes-García, L. E. Córdova-Dávalos [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 685865.

252. Rifaximin protects against malathion-induced rat testicular toxicity: a possible clue on modulating gut microbiome and inhibition of oxidative stress by mitophagy / N. N. Omar, R. A. Mosbah, W. S. Sarawi [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 13. – P. 4069.

253. Rim, K. T. Reproductive toxic chemicals at work and efforts to protect workers' health: a literature review / K. T. Rim // *Safety and Health at Work*. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. 143–150.
254. Risk factors on testicular function in adolescents / F. Cargnelutti, A. Di Nisio, F. Pallotti [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. – 2022. – Vol. 45, № 9. – P. 1625–1639.
255. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation / W. Eggert-Kruse, I. Kiefer, C. Beck [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2007. – Vol. 87, № 4. – P. 810–823.
256. Role of follicle-stimulating hormone, inhibin B, and anti-Müllerian hormone in predicting sperm retrieval from men with nonobstructive azoospermia undergoing microdissection testicular sperm extraction: a systematic review and meta-analysis / E. Pozzi, C. Corsini, F. Belladelli [et al.] // *European Urology Open Science*. – 2024. – Vol. 65. – P. 3–12.
257. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in testicular immune-privilege / G. S. Gualdoni, P. V. Jacobo, C. M. Sobarzo [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 15919.
258. Role of semen analysis in subfertile couples / J. W. van der Steeg, P. Steures, M. J. Eijkemans [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95, № 3. – P. 1013–1019.
259. Role of the gut microbiota in nutrition and health / A. M. Valdes, J. Walter, E. Segal, T. D. Spector // *BMJ*. – 2018. – Vol. 361. – P. k2179.
260. Role of the microbiome in human development / M. G. Dominguez-Bello, F. Godoy-Vitorino, R. Knight, M. J. Blaser // *Gut*. – 2019. – Vol. 68, № 6. – P. 1108–1114.
261. Ruthig, V. A. Updates in Sertoli cell-mediated signaling during spermatogenesis and advances in restoring Sertoli cell function / V. A. Ruthig, D. J. Lamb // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 897196.

262. SARS-CoV-2 and its relationship with the genitourinary tract: implications for male reproductive health in the context of COVID-19 pandemic / J. Hallak, T. A. Teixeira, F. S. Bernardes [et al.] // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 73–79.

263. SARS-CoV-2 pandemic and repercussions for male infertility patients: a proposal for the individualized provision of andrological services / S. C. Esteves, P. Humaidan, M. Roque [et al.] // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 10–18.

264. Sathya Srin, V. Does varicocelectomy improve gonadal function in men with hypogonadism and infertility? Analysis of a prospective study / V. Sathya Srin, S. Belur Veerachari // *International Journal of Endocrinology*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 916380.

265. Schlegel, P. N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision / P. N. Schlegel // *Human Reproduction*. – 1999. – Vol. 14. – P. 131–135.

266. Schlegel, P. N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision / P. N. Schlegel // *Human Reproduction*. – 1999. – Vol. 14. – P. 131–135.

267. Schoenmakers, S. The matter of the reproductive microbiome / S. Schoenmakers, R. Steegers-Theunissen, M. Faas // *Obstetric Medicine*. – 2019. – Vol. 12, № 3. – P. 107–115.

268. Screening for bacterial pathogens in semen samples from infertile men with and without leukocytospermia / R. Gdoura, W. Kchaou, A. Znazen [et al.] // *Andrologia*. – 2008. – Vol. 40, № 4. – P. 209–218.

269. Semen microbiota and cytokines of healthy and infertile men / O. V. Bukharin, N. B. Perunova, E. V. Ivanova [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2022. – Vol. 24, № 4. – P. 353–358.

270. Semen microbiota in normal and leukocytospermic males / Y. Yao, X. J. Qiu, D. S. Wang [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2022. – Vol. 24, № 4. – P. 398–405.

271. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-

obstructive azoospermia / H. Chen, T. Luo, T. Chen, G. Wang // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 2884–2890.

272. Seminal microbiota of idiopathic infertile patients and its relationship with sperm DNA integrity / S. Garcia-Segura, J. Del Rey, L. Closa [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 937157.

273. Sender, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans / R. Sender, S. Fuchs, R. Milo // *Cell*. – 2016. – Vol. 164, № 3. – P. 337–340.

274. Sex hormones, sex chromosomes, and microbiota: identification of *Akkermansia muciniphila* as an estrogen-responsive microbiota / A. Sakamuri, P. Bardhan, R. Tummala [et al.] // *Microbiota and Host*. – 2023. – Vol. 1, № 1. – P. e230010.

275. Sexual behavior shapes male genitourinary microbiome composition / E. Toh, Y. Xing, X. Gao [et al.] // *Cell Reports Medicine*. – 2023. – Vol. 4, № 3. – P. e100981.

276. Sharpe, R. M. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? / R. M. Sharpe, N. E. Skakkebaek // *Lancet*. – 1993. – Vol. 341, № 8857. – P. 1392–1395.

277. Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells / L. Zhao, C. Yao, X. Xing [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – P. 5683.

278. Single-cell molecular profiling provides a high-resolution map of basophil and mast cell development / F. K. Hamey, W. W. Y. Lau, I. Kucinski [et al.] // *Allergy*. – 2021. – Vol. 76, № 6. – P. 1731–1742.

279. Sirota, I. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology / I. Sirota, S. M. Zarek, J. H. Segars // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2014. – Vol. 32, № 1. – P. 35–42.

280. Sisti, G. Maternal immunity and pregnancy outcome: focus on preconception and autophagy / G. Sisti, T. T. Kanninen, S. S. Witkin // *Genes and*

Immunity. – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 1–7.

281. Sonnex, C. Toll-like receptors and genital tract infection / C. Sonnex // International Journal of STD & AIDS. – 2010. – Vol. 21. – P. 153–157.

282. Souho, T. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review / T. Souho, M. Benlemlih, B. Bennani // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. e0126936.

283. Sperm DNA fragmentation testing: summary evidence and clinical practice recommendations / S. C. Esteves, A. Zini, R. M. Coward [et al.] // Andrologia. – 2021. – Vol. 53, № 2. – P. e13874.

284. Sperm microbiota and its impact on semen parameters / D. Baud, C. Pattaroni, N. Vulliemoz [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 234.

285. Sperm retrieval techniques in patients with non-obstructive azoospermia / N. D. Akhvlediani, I. A. Reva, A. S. Chernushenko, D. Y. Pushkar // Urologiia. – 2021. – № 4. – P. 106–113.

286. Sperm transcriptome analysis accurately reveals male fertility potential in livestock / R. Indriastuti, B. P. Pardede, A. Gunawan [et al.] // Animals. – 2022. – Vol. 12, № 21. – P. 2955.

287. Spermatid microbiome characteristics in infertile patients: impact on sperm count, mobility, and morphology / C. Gachet, M. Prat, C. Burucoa [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – Vol. 11. – P. 1505.

288. Stanton, P. G. Regulation of the blood-testis barrier / P. G. Stanton // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2016. – Vol. 59. – P. 166–173.

289. Steiner, A. Z. The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial / A. Z. Steiner, K. R. Hansen, K. T. Barnhart [et al.] // Fertility and Sterility. – 2020. – Vol. 113. – P. 552–560.

290. Subinguinal microsurgical varicocelectomy for male factor subfertility: ten-year experience / L. Leung, K. L. Ho, P. C. Tam, M. K. Yiu // Hong Kong Medical

Journal. – 2013. – Vol. 19, № 4. – P. 334–340.

291. Suliga, E. The relationship between diet, energy balance and fertility in men / E. Suliga, S. Głuszek // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. – 2020. – Vol. 90. – P. 514–526.

292. Swan, S. H. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data / S. H. Swan, E. P. Elkin, L. Fenster // *Environmental Health Perspectives*. – 1997. – Vol. 105, № 11. – P. 1228–1232.

293. systemic review and meta-analysis exploring the predictors of sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia and chromosomal abnormalities / A. Majzoub, M. Arafa, H. Clemens [et al.] // *Andrologia*. – 2022. – Vol. 54, № 3. – P. e14303.

294. T cell responses to the microbiota / I. I. Ivanov, T. Tuganbaev, A. N. Skelly, K. Honda // *Annual Review of Immunology*. – 2022. – Vol. 40. – P. 559–587.

295. T lymphocytes and testicular immunity: a new insight into immune regulation in testes / J. Gong, Q. Zeng, D. Yu, Y. G. Duan // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 22. – P. 57.

296. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells / I. W. Nasr, Y. Wang, G. Gao [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 174. – P. 6161–6168.

297. Testicular immunity and its connection with the microbiota. Physiological and clinical implications in the light of personalized medicine / L. Santacroce, C. Imbimbo, A. Ballini [et al.] // *Journal of Personalized Medicine*. – 2022. – Vol. 12, № 8. – P. 1335.

298. Testicular microbiome in azoospermic men: first evidence of the impact of an altered microenvironment / M. Alfano, R. Ferrarese, I. Locatelli [et al.] // *Human Reproduction*. – 2018. – Vol. 33. – P. 1212–1217.

299. Testin regulates the blood-testis barrier via disturbing occludin/ZO-1 association and actin organization / L. Su, Z. Wang, S. Xie [et al.] // *Journal of Cellular*

Physiology. – 2020. – Vol. 235. – P. 6127–6138.

300. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion / M. Fijak, E. Schneider, J. Klug [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186. – P. 5162–5172.

301. The “Scourge of the Renaissance”. A short review about *Treponema pallidum* infection / L. Santacroce, L. Bottalico, S. Topi [et al.] // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. – 2020. – Vol. 20. – P. 335–343.

302. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele / Y. Sakamoto, T. Ishikawa, Y. Kondo [et al.] // *BJU International*. – 2008. – Vol. 101, № 12. – P. 1547–1552.

303. The causal relationship between gut microbiota and male reproductive and sexual health / S. C. Ma, C. M. Zhang, X. H. Hao [et al.] // *Zhonghua Nan Ke Xue*. – 2023. – Vol. 29, № 7. – P. 587–595.

304. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure / J. Štšepetova, J. Baranova, J. Simm [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 3.

305. The connection between physical exercise and gut microbiota, implications for competitive sports athletes / A. E. Wegierska, I. A. Charitos, S. Topi [et al.] // *Sports Medicine*. – 2022. – Vol. 52, № 10. – P. 2355–2369.

306. The detoxication of nitrate by two antioxidants or a probiotic, and the effects on blood and seminal plasma profiles and reproductive function of New Zealand White rabbit bucks / Y. A. Attia, E. A. Abd El Hamid, A. M. Ismaiel, A. El-Nagar // *Animal*. – 2013. – Vol. 7, № 4. – P. 591–601.

307. The effect of bacteriospermia and leukocytospermia on conventional and nonconventional semen parameters in healthy young normozoospermic males / M. Fraczek, M. Hryhorowicz, K. Gill [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 118. – P. 18–27.

308. The effect of positive semen bacterial and Ureaplasma cultures on in vitro fertilization success / S. Shalika, K. Dugan, R. D. Smith, S. L. Padilla // *Human Reproduction*. – 1996. – Vol. 11, № 12. – P. 2789–2792.

309. The effects of microbiota on reproductive health: a review / N. Wang, L. Chen, K. Yi [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2024. – Vol. 64, № 6. – P. 1486–1507.

310. The elusive male microbiome: revealing the link between the genital microbiota and fertility. Critical review and future perspectives / M. Jendraszak, I. Skibińska, M. Kotwicka, M. Andrusiewicz // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. – 2024. – Vol. 61, № 7. – P. 559–587.

311. The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice / M. Al-Asmakh, J. B. Stukenborg, A. Reda [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e103809.

312. The gut microbiota contributes to methamphetamine-induced reproductive toxicity in male mice / J. L. Liu, L. J. Chen, Y. Liu [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024. – Vol. 279. – P. 116457.

313. The gut microbiota is a major regulator of androgen metabolism in intestinal contents / H. Colldén, A. Landin, V. Wallenius [et al.] // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2019. – Vol. 317, № 6. – P. 1182–1192.

314. The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly / F. Zhang, D. Aschenbrenner, J. Y. Yoo, T. Zuo // *Lancet Microbe*. – 2022. – Vol. 3, № 12. – P. 969–983.

315. The human coronaviruses (HCoV)s and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection / L. Santacroce, A. Man, I. A. Charitos [et al.] // *Journal of Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 99. – P. 93–106.

316. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction / A. Agarwal, C. Barbărosie, R. Ambar, R. Finelli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 3882.

317. The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic

endocrine system / X. Qi, C. Yun, Y. Pang, J. Qiao // *Gut Microbes*. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 1–21.

318. The influence of SARS-CoV-2 on semen parameters of infected infertile male in comparison with those that noninfected / B. R. Ali, S. A. Atiyah, H. T. Yser [et al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – P. e24568.

319. The influence of sexual activity on the vaginal microbiota and *Gardnerella vaginalis* clade diversity in young women / L. A. Vodstrcil, J. Twin, S. M. Garland [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. e0171856.

320. The interplay between androgen and gut microbiota: is there a microbiota-gut-testis axis / X. Li, W. Cheng, H. Shang [et al.] // *Reproductive Sciences*. – 2022. – Vol. 29, № 6. – P. 1674–1684.

321. The intestinal microbiota may be a potential theranostic tool for personalized medicine / M. Di Domenico, A. Ballini, M. Boccellino [et al.] // *Journal of Personalized Medicine*. – 2022. – Vol. 12. – P. 523.

322. The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids / B. P. Hermann, K. Cheng, A. Singh [et al.] // *Cell Reports*. – 2018. – Vol. 25. – P. 1650–1667.

323. The microbiome and male infertility: looking into the past to move forward / O. Alqawasmeh, E. Fok, H. Yim [et al.] // *Human Fertility*. – 2023. – Vol. 26, № 3. – P. 450–462.

324. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer / C. M. Porter, E. Shrestha, L. B. Peiffer, K. S. Sfanos // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2018. – Vol. 21, № 3. – P. 345–354.

325. The microbiome of the infertile male / S. D. Lundy, S. C. Vij, A. H. Rezk [et al.] // *Current Opinion in Urology*. – 2020. – Vol. 30, № 3. – P. 355–362.

326. The negative impact of most relevant infections on fertility and assisted reproduction technology / L. Carbone, A. Conforti, A. La Marca [et al.] // *Minerva Obstetrics and Gynecology*. – 2022. – Vol. 74, № 1. – P. 83–106.

327. The origin of lymphatic capillaries in murine testes / S. Hirai, M. Naito,

H. Terayama [et al.] // *Journal of Andrology*. – 2012. – Vol. 33. – P. 745–751.

328. The presence of bacteria species in semen and sperm quality / E. Moretti, S. Capitani, N. Figura [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2009. – Vol. 26, № 1. – P. 47–56.

329. The reproductive microbiome: an emerging driver of sexual selection, sexual conflict, mating systems, and reproductive isolation / M. Rowe, L. Veerus, P. Trosvik [et al.] // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2020. – Vol. 35, № 3. – P. 220–234.

330. The role of mast cells in male infertility / G. Haidl, Y. G. Duan, S. J. Chen [et al.] // *Expert Review of Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 627–634.

331. The role of resveratrol in mammalian reproduction / R. Pasquariello, N. Verdile, T. A. L. Brevini [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 4554.

332. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis / R. Zhou, J. Wu, B. Liu [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – Vol. 76. – P. 2681–2695.

333. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: a systematic review and meta-analysis / L. Farahani, T. Tharakan, T. Yap [et al.] // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 115–144.

334. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection / C. M. Liu, B. J. Osborne, B. A. Hungate [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2014. – Vol. 10, № 7. – P. e1004262.

335. The seminal plasma microbiome of men with testicular germ cell tumours described by small RNA sequencing / N. Mørup, A. M. Main, N. Jørgensen [et al.] // *Andrology*. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 756–769.

336. The toxic effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on gut microbiota: Bisphenol A (BPA). A review / I. A. Charitos, S. Topi, R. Gagliano-Candela [et al.] // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. – 2022. – Vol. 22. – P. 716–727.

337. The toxic mechanism of 6:2 Cl-PFESA in adolescent male rats: endocrine

disorders and liver inflammation regulated by the gut microbiota-gut-testis/liver axis / N. Zhao, Y. Kong, Q. Yuan [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2023. – Vol. 459. – P. 132155.

338. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study / R. Koedooder, M. Singer, S. Schoenmakers [et al.] // *Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 34, № 6. – P. 1042–1054.

339. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors / E. Gomez Perdiguero, K. Klapproth, C. Schulz [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 518. – P. 547–551.

340. Transcriptomics technologies / R. Lowe, N. Shirley, M. Bleakley [et al.] // *PLoS Computational Biology*. – 2017. – Vol. 13. – P. e1005457.

341. Translating microbiome research from and to the clinic / Z. J. Zhang, C. J. Lehmann, C. G. Cole, E. G. Pamer // *Annual Review of Microbiology*. – 2022. – Vol. 76. – P. 435–460.

342. Tremellen, K. Gut Endotoxin Leading to a Decline IN Gonadal function (GELDING) – a novel theory for the development of late onset hypogonadism in obese men / K. Tremellen // *Basic and Clinical Andrology*. – 2016. – Vol. 26. – P. 7.

343. TSPAN8 expression distinguishes spermatogonial stem cells in the prepubertal mouse testis / K. Mutoji, A. Singh, T. Nguyen [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2016. – Vol. 95. – P. 117.

344. Undergoing varicocele repair before assisted reproduction improves pregnancy rate and live birth rate in azoospermic and oligospermic men with a varicocele: a systematic review and meta-analysis / E. W. Kirby, L. E. Wiener, S. Rajanahally [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2016. – Vol. 106, № 6. – P. 1338–1343.

345. Unexplained male infertility: diagnosis and management / A. Hamada, S. C. Esteves, M. Nizza, A. Agarwal // *International Brazilian Journal of Urology*. – 2012. – Vol. 38, № 5. – P. 576–594.

346. Urogenital infection as a risk factor for male infertility / H. C. Schuppe,

A. Pilatz, H. Hossain [et al.] // *Deutsches Ärzteblatt International*. – 2017. – Vol. 114. – P. 339–346.

347. Van Der Pol, W. Microbial communities of the male / W. Van Der Pol, D. E. Nelson // *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Third Edition. – 2020.

348. Varicocele repair improves testicular histology in men with nonobstructive azoospermia / M. Ustuner, H. Yilmaz, U. Yavuz [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 709452.

349. Varicolectomy: semen parameters and protamine deficiency / M. H. Nasr-Esfahani, H. Abasi, S. Razavi [et al.] // *International Journal of Andrology*. – 2009. – Vol. 32, № 2. – P. 115–122.

350. Varicocele-mediated male infertility: from the perspective of testicular immunity and inflammation / Y. Fang, Y. Su, J. Xu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 12. – P. e729539.

351. Wang, P. Microbiome-metabolome reveals the contribution of the gut-testis axis to sperm motility in sheep (*Ovis aries*) / P. Wang, Y. G. Duan // *Animals*. – 2023. – Vol. 13, № 6. – P. 996.

352. Wang, P. The role of dendritic cells in male reproductive tract / P. Wang, Y. G. Duan // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 76. – P. 186–192.

353. Wang, Y. Exploring the role of gut microbiome in male reproduction / Y. Wang, Z. Xie // *Andrology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 441–450.

354. WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. – Geneva : World Health Organization, 2021.

355. Worse progression of COVID-19 in men: is testosterone a key factor? / V. A. Giagulli, E. Guastamacchia, T. Magrone [et al.] // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 53–64.

356. Yunzhi, X. Mast cell and autoimmune diseases / X. Yunzhi, C. Guangjie // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – Article ID 246126. – Режим доступа:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/246126>

357. Zika virus tropism during early infection of the testicular interstitium and its role in viral pathogenesis in the testes / K. A. Tsetsarkin, J. A. Acklin, G. Liu [et al.] // PLoS Pathogens. – 2020. – Vol. 16. – P. e1008601.