

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13.03.2019 № 124н "Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения".

2. Статистические материалы. Общая заболеваемость взрослого населения России в 2011-2019 году / подготовлен Департаментом мониторинга, анализа, и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва: 2012-2019.

3. Статистические материалы. Первичная заболеваемость взрослого населения России, впервые выявленная в 2011-2019 году / подготовлен Департаментом мониторинга, анализа, и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва: 2012-2019.

4. Указ Президента Российской Федерации от 21 июля 2020 г. N 474 "О национальных целях развития Российской Федерации на период до 2030 года".

УДК 579.2

**Паначева Е.А., Зорников Д.Л., Иванов А.В., Ворошилина Е.С.
МИКРОБИОТА ЭЯКУЛЯТА ПРИ АЗОСПЕРМИИ: КЛАСТЕРНЫЙ
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ
МЕТОДОМ ПЦР-РВ**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Уральский государственный медицинский университет
Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н.
Ельцина
Екатеринбург, Российская Федерация

**Panacheva E.A., Zornikov D.L., Ivanov A.V., Voroshilina E.S.
THE MICROBIOTA OF AZOOSPERMIA SPERM SAMPLES BY PCR-
REAL TIME METHOD**

Department of microbiology, virology and immunology
Ural State Medical University
Ural Federal University named after
the first President of Russia B.N. Yeltsin
Yekaterinburg, Russian Federation
E-mail: evgenia.snigireva@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены данные о микробном составе 20 образцов эякулята с азооспермией, полученные методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Кластерный анализ микробного состава позволил выделить 4 устойчивых кластера микроорганизмов.

Annotation. The article deals with the microbiota of azoospermia sperm samples of 20 men by real-time PCR method. Cluster analysis of the microbial composition allowed to identify 4 stable clusters of microorganisms.

Ключевые слова: кластерный анализ, ПЦР-РВ, микробиота эякулята, азооспермия

Keywords: cluster analysis, PCR-RT, sperm microbiota, azoospermia

Введение

Среди причин мужского бесплодия доля азооспермии может достигать 20%. Считается, что одной из главных причин отсутствия сперматозоидов являются генетические факторы, включающие хромосомные аномалии, однако некоторые авторы делают сдержанные выводы о взаимосвязи азооспермии с микробиотой эякулята [4,7]. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано негативное влияние определенных МО не только на функции сперматозоидов, но и на процесс сперматогенеза. Установлено, что *Bacteroides ureolyticus* могут являться причиной снижения подвижности сперматозоидов в результате повреждения билипидного слоя мембран [7]. В другом исследовании с применением метода NGS (целевой участок бактериального генома — ген 16S рРНК) было выявлено повышение количества бактерий рода *Anaerococcus* spp. при астенозооспермии [8]. В настоящее время обсуждается роль *Lactobacillus* spp. в развитии репродуктивных и эндокринных нарушений у мужчин [2,4]. Повышение количества лактобактерий приводит к изменению pH семенной жидкости и последующему снижению подвижности сперматозоидов. Chen et al. выявили взаимосвязь повышенного количества *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. в образцах эякулята с азооспермией [4]. Для оценки микробиоты эякулята помимо традиционного бактериологического метода все чаще применяют молекулярно-биологические методы, например, ПЦР. В нескольких работах показана возможность использования коммерческого набора «Андрофлор» (набор для проведения ПЦР-РВ на 24 группы МО) [1,3], в том числе его большая информативность в сравнении с культуральным методом.

Цель исследования - провести исследование микробиоты эякулята при азооспермии с помощью ПЦР-РВ.

Материалы и методы исследования

В период с января 2019 г. по март 2020 г. были исследованы образцы 20 эякулята мужчин, средний возраст которых составил $31 \pm 1,2$ года. Пациенты обратились в указанный период в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург, n = 12) и в урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии (г. Иваново, n = 8) по поводу бесплодия или для

прегравидарной подготовки. Критерии исключения из исследования: наличие эндокринной патологии; наличие инфекций, передающихся половым путем; наличие аномалий кариотипа, мутаций в гене CFTR, микроделеций в AZF- локусе Y-хромосомы.

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛЮС («ДНК-Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. Расчет количества общей бактериальной массы (ОБМ) и каждого из условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в образце выражали в геном-эквивалентах на 1 мл (ГЭ/мл). Значимым считали количество МО не менее 10^3 ГЭ/мл, что соответствовало положительному сигналу в ПЦР-РВ до 35 цикла. Исключение составляли *Ureaplasmaurealyticum*, *Ureaplasmaparvum*, *Mycoplasma hominis*. По этим группам МО получение сигнала на любом цикле расценивали как положительный результат.

Анализ структурных особенностей микробиоты эякулята проводили с использованием модели кластеризации MSSC, минимизирующей сумму по всем кластерам внутрикластерных сумм квадратов расстояний от элементов кластеров до их центров-центроидов. Решение задачи кластеризации проводили с использованием алгоритма *k-means++*, реализованного в библиотеке машинного обучения *scikit-learn*[4,6].

Результаты исследования и их обсуждение

Общая бактериальная масса (ОБМ) в количестве более 10^3 ГЭ/мл была выявлена в 17 (85%) из 20 образцов. При этом во всех 17 пробах помимо высокой ОБМ как минимум одна группа МО была выше 10^3 ГЭ/мл. В 2 (15%) пробах бактериальная ДНК присутствовала в количестве менее 10^3 ГЭ/мл. Низкая ОБМ сопоставима с отрицательным контролем, и такие пробы в последующем не интерпретировались.

В 6 пробах (30%) из 20 было обнаружено по 1 группе МО в количестве 10^3 ГЭ/мл и выше, в остальных случаях были выявлены различные ассоциации с одновременным присутствием в образце от 2 до 14 групп МО (Рис.1). В 4 образцах (20%) из 20 выявлены бактерии вида *Mycoplasmaparvum*.

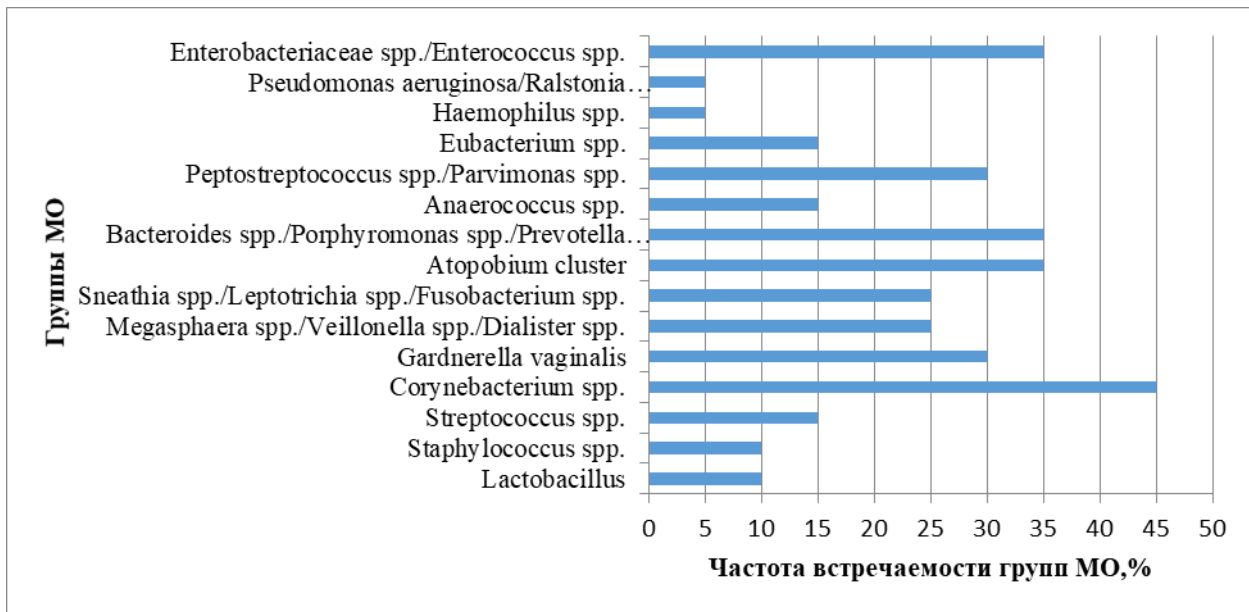


Рис.1 Частота встречаемости отдельных групп МО в 17 образцах эякулята
ОБМ $\geq 10^3$ ГЭ/мл (n= 17)

Разные группы МО встречались во множестве ассоциаций друг с другом. Поэтому было принято решение провести кластерный анализ с целью определения характерных для эякулята микробных сообществ. Каждый из полученных кластеров отличался преобладанием определенной укрупненной группы МО. Было выделено четыре устойчивых кластера микробиоты.

Кластер 1 — вариант с преобладанием группы *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp. (ЕЕ). Абсолютное количество всех ЕЕ было сопоставимо с ОБМ и составило в центроиде 104,3 ГЭ/мл. Доля ЕЕ в центроиде составила 74,9% относительно ОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята был определен в 4 (23,5%) из 17 образцов. Кластер 2 — вариант с преобладанием грамположительных факультативных анаэробов (ГПФА). Абсолютное количество всех ГПФА было сопоставимо с ОБМ и в центроиде составило 103,2 ГЭ/мл. Доля ГПФА в центроиде составила 100% относительно ОБМ. Данный вариант микробиоты выявляли в 2 (11,7%) из 17 образцов. Азооспермия характеризуется большей абсолютной массой бактерий *Corynebacterium* spp. Кластер 3 — вариант с преобладанием облигатных анаэробов (ОА). Абсолютное количество всех ОА было сопоставимо с ОБМ и составило в центроиде 104 ГЭ/мл (рис. 1А). Доля ОА в центроиде достигала 87,6% относительно ОБМ. Данный вариант микробиоты определяли в 9 (52,9%) из 17 образцов. Азооспермия характеризуется большей абсолютной массой бактерий *Bacteroides* spp./*Porphyromonas* spp./*Prevotella* spp. Кластер 4 — вариант с преобладанием *Lactobacillus* spp. В образцах, отнесенных к данному кластеру, абсолютное количество *Lactobacillus* spp. было сопоставимо с ОБМ и составило в центроиде 105,0 ГЭ/мл (рис. 1Б). Доля *Lactobacillus* spp. в центроиде достигала 81,6% относительно ОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята идентифицировали в 2 (11,7%) из 17 образцов.

Результаты данного исследования подтверждают наблюдения других авторов о гетерогенном составе микробиоты эякулята, которая может быть сгруппирована в ряд кластеров.

Выводы:

1. Методом ПЦР-РВ бактериальную ДНК в количестве не менее 10^3 ГЭ/мл выявляли в 85% образцов эякулята; в 70% проб эякулята одновременно определяли от 2 до 14 групп МО в надпороговых значениях.

2. Было выделено четыре устойчивых кластера микробиоты эякулята, каждый из которых отличался преобладанием определенной укрупненной группы микроорганизмов: облигатные анаэробы, *Lactobacillus* spp., грамположительных факультативных анаэробов, *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp.

3. В половине образцов эякулята микробиота была представлена кластером 3 (с преобладанием облигатных анаэробов), для которого характерно наибольшее видовое разнообразие. В этом кластере по абсолютной бактериальной массе доминировали *Bacteroides* spp./*Porphyromonas* spp./*Prevotella* spp.

Список литературы:

1. 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. - 44с.

2. Почерников Д. Г. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus* spp. в эякуляте/ Г.Д. Почерников, Н. Т. Постовойтенко, В. В. Гетьман, И. С. Галкина//Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2020. -№ 3.

3. Почерников Д.Г. Сравнительный анализ культурального и молекулярно-генетического методов в исследовании микробиоты эякулята при мужской инфертильности/Г.Д. Почерников, Н.Т.Постовойтенко, А.И. Стрельников//Андрология и генитальная хирургия. - 2019;20(2):40–7.

4. Arthur D., Vassilvitskii S.. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics) 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007). P. 1027–1035.

5. Chen Houyang, et al. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. Experimental and therapeutic medicine. 2018;15: 2884-2890.

6. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. ACM computing surveys (CSUR). 1999; 31 (3): 264–323.

7. Junjie Yang and Lei Zhang, et al. Potential pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of patients with Different Types of Dysspermatism. Scientific Reports (2020) 10:6876

8. Hou D, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. Fertil Steril. 2013; 100 (5):1261–9