

## WPŁYW MIKROBIOTY UKŁADU ROZRODCZEGO NA PŁODNOŚĆ ŻEŃSKĄ I MĘSKĄ. ROLA BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*

Aneta Kiecka<sup>1\*</sup>, Barbara Macura<sup>2</sup>, Marian Szczepanik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Katedra Biologii Medycznej

<sup>2</sup> Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w marcu 2021 r.

**Streszczenie:** Od dawna wiadomo, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią dominujący składnik mikrobioty pochwy i pełną ochronną rolę dla mikrośrodowiska pochwy. Obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* potwierdzono również w górnej części układu rozrodczego żeńskiego oraz w męskim układzie rozrodczym i w spermie. Niniejsza praca stanowi przegląd najnowszej literatury dotyczącej wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na płodność, z uwzględnieniem zarówno czynnika żeńskiego, jak i męskiego. Rola mikrobioty może okazać się niezwykle istotna w przypadkach niepłodności idiopatycznej. Najnowsze doniesienia wskazują na możliwy związek pomiędzy obecnością bakterii z rodzaju *Lactobacillus* a efektywnością technik wspomaganego rozrodu. Wyniki badań potwierdzają, że środowisko mikrobiologiczne układu rozrodczego to ważny a zarazem słabo poznany czynnik wpływający na płodność człowieka.

1. Wprowadzenie 2. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym. 3. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym. 4. Mikrobiota nasienia 5. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w nasieniu. 6. Mikrobiota a niepłodność idiopatyczna 7. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* a efektywność technik wspomaganego rozrodu. 8. Podsumowanie

### THE INFLUENCE OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM MICROBIOTA ON FEMALE AND MALE FERTILITY. THE ROLE OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA

**Abstract:** It is well known, that vaginal microbiota is dominated by *Lactobacillus* genus. These bacteria protect a vaginal microenvironment against the invading pathogens. The presence of *Lactobacillus* communities was already confirmed in an upper female reproductive system, as well as in the male reproductive system and semen. In this paper we present the current state of knowledge about the influence of the *Lactobacillus* species on female and male fertility. We also discuss the possible role of the reproductive system microbiota in an idiopathic infertility, and the association between *Lactobacillus* species and effectiveness of assisted reproductive techniques. Further research on the relationship between the reproductive system microbiota and human fertility is needed.

1. Introduction 2. *Lactobacillus* bacteria in the female reproductive system 3. The role of *Lactobacillus* bacteria in the female reproductive system. 4. Semen microbiota 5. The role of *Lactobacillus* bacteria in semen 6. Microbiota and idiopathic infertility. 7. *Lactobacillus* bacteria and the effectiveness of assisted reproductive techniques. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus*, niepłodność idiopatyczna, płodność, techniki wspomaganego rozrodu

**Keywords:** *Lactobacillus*, idiopathic infertility, fertility, assisted reproductive techniques

### 1. Wprowadzenie

Organizm człowieka i mikroorganizmy mikrobioty stanowią skomplikowany i zróżnicowany system wzajemnych zależności i interakcji. Wraz z szybkim rozwojem technik molekularnych możliwe jest poznanie składu mikrobioty w poszczególnych narządach i układach organizmu człowieka, dotychczas często uważanych za sterylne. W ciągu ostatnich lat podjęto intensywne badania nad rolą mikrobioty w patogenezie różnych schorzeń, w tym również chorób cywilizacyjnych. Do tej grupy schorzeń zalicza się między innymi otyłość, cukrzycę, nowotwory, choroby układu krążenia,

depresję, a także zaburzenia płodności [34, 35]. Protekcyjna rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie jest od dawna znana, niemniej jednak dokładny mechanizm działania oraz możliwy wpływ na płodność nie jest do końca jasny i wymaga dalszych badań. Najnowsze wyniki badań wskazują również na obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pozostałych częściach układu rozrodczego żeńskiego oraz w nasieniu [14, 58, 59]. Ich wpływ na utrzymanie płodności u obu płci nadal pozostaje niejasny. Innym niezwykle obiecującym obszarem badań jest wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na efektywność technik wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technology, ART) [58, 59].

\* Autor korespondencyjny: Aneta Kiecka, Katedra Biologii Medycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kopernika 7a, 31-034 Kraków; e-mail: aneta.kiecka@uj.edu.pl

## 2. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym

W 1892 roku Albert Döderlein po raz pierwszy opisał obecność Gram-dodatnich bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie zdrowych kobiet w wieku rozrodczym. Bakterie te nazywamy obecnie pałeczkami kwasu mlekowego lub pałeczkami Döderleina [57, 68]. Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje wiele gatunków, które są niezwykle zróżnicowane morfologicznie. Bakterie te są fakultatywnymi beztlenowcami, kolonizującymi zarówno powierzchnię nabłonka pochwy, jak i przewodu pokarmowego oraz jamy ustnej ludzi i zwierząt [62, 68].

Skład mikrobioty pochwy zmienia się w czasie życia kobiety. Po porodzie naturalnym, przez pierwsze dwa tygodnie życia u noworodków płci żeńskiej, występują w pochwie pałeczki *Lactobacillus* pochodzące z dróg rodnych matki. Obecne są również mikroorganizmy tlenowe tj.: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* oraz bakterie mlekowe tj.: względnie beztlenowe *Enterococcus*. Natomiast wśród beztlenowców są obecne bakterie z rodzaju: *Peptococcus* i *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Eubacteria*, *Propionibacterium* i *Bacteroides* [21, 23]. W okresie dojrzewania kobiet wzrost syntezy estrogenów sprzyja proliferacji i dojrzewaniu komórek nabłonka pochwy oraz akumulacji w nich glikogenu. Glikogen jest katabolizowany przez ludzką  $\alpha$ -amylazę do maltozy, maltotriozy i  $\alpha$ -dekstryn, które następnie są metabolizowane do kwasu mlekowego przez pałeczki *Lactobacillus*. Tworzy to kwaśne środowisko pochwy (pH 3,5–4,5), sprzyjające rozwojowi pałeczek kwasu mlekowego kosztem patogennych bakterii. Ponadto zmiany składu mikrobioty pochwy można obserwować także w trakcie cyklu miesięczkowego. Wiadomo, że w okresie rozrodczym poziom estrogenów zmienia się w trakcie cyklu. Najwyższe poziomy estrogenów występują tuż przed owulacją, a najniższe w czasie miesiączki. Estrogeny powodują między innymi wzrost syntezy glikogenu w komórkach nabłonka pochwy. Glikogen, jak już wspomniano, stanowi substrat dla bakterii *Lactobacillus*, i produkcji kwasu mlekowego, który zakwasza środowisko pochwy. Różnice w poziomach estrogenów i zawartości glikogenu w komórkach pochwy w czasie cyklu miesięczkowego mogą wpływać na skład mikrobioty pochwy. Mikrobiota pochwy wydaje się być bardziej stabilna w czasie, kiedy poziomy estrogenów przyjmują najwyższe wartości, a mniej stabilna w czasie miesiączki. Zjawisko to jest związane z wahaniami wartości pH w czasie cyklu. W trakcie miesiączki obserwuje się wzrost pH pochwy spowodowane obecnością krwi menstruacyjnej i tymczasowe zmniejszenie ilości pałeczek *Lactobacillus*. Dominacja *Lactobacilli* maleje wraz ze spadkiem poziomu estrogenów w okresie menopauzy, podczas stosowania antykoncepcji hormonalnej lub innych zaburzeń hormonalnych [4, 18, 44].

Mikrobiota pochwy zdrowych kobiet w wieku rozrodczym stanowi biomasę około miliarda bakterii na gram wydzieliny pochwowej. Cechuje się ona niewielką bioróżnorodnością. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią około 99,97% wszystkich bakterii zasiedlających pochwę, przy czym najpowszechniejsze gatunki to: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* oraz *Lactobacillus jensenii* [14, 36, 48, 42]. W klasyfikacji CST wyróżnia się kilka typów mikrobioty pochwy (community state types, CST). CST-I (45,4%), CST-II (8,2%), CST-III (26,8%) i CST-V (9,3%) są zdominowane odpowiednio przez *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* i *L. jensenii* [51]. W grupie CST-IV (10,3%), w której *Lactobacillus* nie jest gatunkiem dominującym, charakterystyczna jest obecność takich bakterii jak: *Gardnerella*, *Pretovella*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Atopobium*, *Streptococcus*, *Dialister*, *Lachnospira*, *Anaerococcus*, *Petoniphilus*, *Eggerthella*, *Fingoldia*, *Rhodobaca*, *Anaerotruncus*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Aerococcus*, *Parvimonas*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Veillonella* [18, 27, 51]. Analiza mikrobioty pochwy kobiet w wieku rozrodczym, z różnych grup etnicznych, wykazała, że odsetek kobiet, u których wykryto dominację bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosi około 90% w populacji białej, 80% w populacji azjatyckiej, 60% w populacji latynoskiej i 37–60% w populacji afroamerykańskiej. Zróżnicowanie to może być skutkiem zarówno predyspozycji genetycznych, jak i czynników geograficznych, ekonomicznych i społecznych [6, 50].

W ostatnich latach potwierdzono obecność mikroorganizmów mikrobioty nie tylko w pochwie, ale także w pozostałych odcinkach układu rozrodczego kobiet [9, 14, 58, 63]. Badania Chen i wsp. z 2017 roku wykazały obecność w szyjce macicy głównie bakterii *Lactobacillus* (>97,56%). W macicy zidentyfikowano pałeczki *Lactobacillus* (30,6%), *Pseudomonas* (9,09%), *Acinetobacter* (9,07%), *Vagococcus* (7,29%), *Sphingobium* (5,0%), natomiast w jajowodach wykazano obecność *Acinetobacter* (18,27%), *Comamonas* (11,49%), *Pseudomonas* (9,9%), *Pseudomonadaceae* (9,1%), *Dysgonomonas* (5,11%) [14]. Kolejne badania z 2018 roku i 2019 roku potwierdziły obecność bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* nie tylko w pochwie, lecz również w pozostałych odcinkach żeńskiego układu rozrodczego [11, 29, 40]. Wykazano, że mikrobiota pochwy charakteryzuje się większą liczebnością bakterii, ale też mniejszą ich bioróżnorodnością w porównaniu z pozostałymi odcinkami żeńskiego układu rozrodczego.

## 3. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w żeńskim układzie rozrodczym

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* dominują w prawidłowej mikrobiocie pochwy. Wypełniając tę niszę, utrudniają kolonizację innym bakteriom. Obniżenie

liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pochwie prowadzi do dysbiozy, która jest zaburzeniem równowagi w składzie mikrobioty. Ponadto *Lactobacillus* produkuje różne substancje, które dodatkowo utrudniają wzrost patogennych bakterii [6, 45, 47].

Głównym czynnikiem o działaniu przeciwbakteryjnym w pochwie jest kwas mlekowy. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają dwie jego odmiany izomeryczne: kwas D-mlekowy i L-mlekowy, przy czym kwas D-mlekowy wykazuje silniejsze działanie ochronne. Kwas mlekowy zakwasza wydzielinę pochwy (do około  $\text{pH} < 4$ ), utrudniając w ten sposób wiązanie innych mikroorganizmów z komórkami nabłonka pochwy oraz wywołując autofagię w komórkach nabłonka w celu degradacji mikroorganizmów wewnątrzkomórkowych. Kwas mlekowy wpływa na blokowanie deacetylazy histonów, pobudzając transkrypcję genów i naprawę DNA [4, 10, 67]. Ze względu na swoje właściwości kwas mlekowy hamuje rozwój infekcji oportunistycznych wywołanych przez *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes simplex* (HSV), *Human papillomavirus* (HPV) i *Human immunodeficiency virus* (HIV) [1, 43]. Kwas mlekowy wykazuje również właściwości immunomodulujące, poprzez indukcję odpowiedzi przeciwwzpalnej w komórkach nabłonka pochwy i szyjki macicy dzięki hamowaniu wydzielania interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ), o których wiadomo, że promują replikację wirusa HIV [61].

Nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) jest związkiem o szerokim działaniu przeciwbakteryjnym, wytwarzanym przez wiele izolatów pałeczek kwasu mlekowego. Wykazano, że 94–95% szczepów *L. crispatus* i *L. jensenii* wytwarza  $\text{H}_2\text{O}_2$  [62].  $\text{H}_2\text{O}_2$  wykazuje wysoką aktywność *in vitro* przeciwko *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*. Produkowany przez *Lactobacilli*  $\text{H}_2\text{O}_2$  może hamować lub niszczyć inne szczepy bakterii pochwoowych, zwłaszcza te z ograniczoną ekspresją enzymów rozkładających  $\text{H}_2\text{O}_2$  w tym m.in. bezwzględnie beztlenowce *Prevotella*, *Peptostreptococcus* i *Gardnerella*. Brak  $\text{H}_2\text{O}_2$  w pochwie powoduje wzrost populacji katalazo-ujemnych organizmów, co jest związane ze zwiększonym ryzykiem infekcji układu moczowopłciowego, w tym zapalenia pochwy i zakażenia HIV [4, 7, 57].

Pochwowe *Lactobacilli* uwalniają także inne substancje ważne dla utrzymania homeostazy mikrobioty pochwy, takie jak bakteriocyny. Są to białka lub kompleksy białek wykazujące silne działanie bakteriobójcze, które swoim działaniu przypominają antybiotyki. Bakteriocyny zabijają patogeny poprzez hamowanie syntezy DNA, RNA i białek lub zakłócenie gradientu pH i potencjału membranowego. Bakteriocyny hamują rozwój niepożądanych w pochwie bakterii, między takich jak: *G. vaginalis*, *E. coli*, *C. albicans* [7, 15, 28].

Ciekawe zagadnienie stanowi gatunek *L. iners*, który jest identyfikowany zarówno w zdrowej pochwie, jak i w pochwie w stanie dysbiozy [4]. Gatunek ten porównując do pozostałych pałeczek kwasu mlekowego nie posiada zdolności do wytwarzania kwasu D-mlekowego oraz nadtlenku wodoru. Powszechnie wiadomo, że produkcja tych związków jest jednym z mechanizmów, dzięki którym pałeczki *Lactobacillus* mogą zapobiegać kolonizacji pochwy przez patogenne bakterie [17]. Mikrobiota zdominowana przez *L. iners* może powodować zwiększenie ryzyka zakażeń przenoszonych drogą płciową takimi mikroorganizmami jak *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, HIV oraz HSV-2 [17, 48, 49].

#### 4. Mikrobiota nasienia

Nasienie, będące mieszaniną plemników oraz wielu substancji, również odżywczych, pochodzących z wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych, stanowi idealne środowisko dla wzrostu mikroorganizmów. Substancje te to między innymi: cukry, w tym fruktoza, lipidy, białka, witaminy, prostaglandyny czy jony nieorganiczne. Fruktoza to podstawowe źródło energii dla plemników, ale jest również wykorzystywana przez mikroorganizmy jako substancja odżywcza. Wbrew wcześniejszemu przekonaniu, nasienie nie jest sterylne, a obecność mikroorganizmów w spermie nie zawsze jest równoznaczna z obniżeniem płodności czy rozwojem infekcji [25, 59].

W układzie rozrodczym męskim bakterie występują głównie w cewce moczowej oraz w spermie. Istnieją doniesienia wskazujące, że mikrobiota spermy oraz cewki moczowej różnią się. Cewka moczowa charakteryzuje się obecnością bakterii pochodzących z okolic odbytu oraz ze skóry partnera i są to między innymi *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* oraz pałeczki Gram-ujemne. Źródłem mikrobioty nasienia może być infekcja układu moczowego lub płciowego, ale także bakterie docierające do układu rozrodczego męskiego drogą krwi z innych narządów lub bakterie pochodzące z kobiecej pochwy. Badania wskazują na dużą międzyosobniczą zmienność w składzie mikrobioty spermy. Nie do końca również wiadomo, jak mikrobiota nasienia zmienia się w czasie u tego samego mężczyzny [24, 37, 59]. Co ciekawe, postuluje się również obecność mikroorganizmów w jądrze [2]. Mikrobiota nasienia jest bardziej zróżnicowana, niż mikrobiota pochwy, ale zawiera mniejszą liczbę bakterii w porównaniu ze środowiskiem pochwy [38]. Obecnie można wyróżnić trzy główne profile mikrobiologiczne nasienia: profil bogaty w bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, profil bogaty w bakterie z rodzaju *Prevotella* oraz profil bogaty w bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Wysoka zawartość bakterii z rodzaju *Lactobacillus*



w spermie koreluje z lepszymi parametrami nasienia, niż w pozostałych dwóch profilach [8, 16, 46]. Wyniki badań, przeprowadzone przez Weng'a i wsp. również wykazały, że w większości próbek spermy bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowiły największy udział procentowy bakterii. W spermie występowały także w znacznej ilości bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Prevotella* oraz *Gardnerella*. Podobne obserwacje poczynił Weng wykazując, iż ilość bakterii *Lactobacillus* była skorelowana z prawidłowymi parametrami nasienia [66].

Najczęściej spotykane rodzaje bakterii w spermie to: *Ralstonia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Clostridiales*, *Atopobium*, *Anaerococcus*, *Gardnerella*, *Rhodanobacter*, *Finexgoldia*, *Haemophilus*, *Planococcaceae* i *Burkholderia* [16, 24]. Zaobserwowano, że niska jakość nasienia koreluje z obecnością takich bakterii jak *Anaerococcus*, *Bacteroides ureolyticus* i *Proteobacteria*, podczas gdy w nasieniu azoospermicznym wykrywane są bakterie z rodzaju *Bacteroidetes* i *Firmicutes* [24, 59]. Obecnie trudno jest określić jednoznaczną granicę pomiędzy prawidłowym a patologicznym składem mikrobioty nasienia. Wiele rodzajów bakterii występujących w nasieniu, występuje również w pochwie partnerki np. *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Atopobium*, co świadczy o tym, że partnerzy seksualni mogą wymieniać się swoją mikrobiotą [56]. Co więcej, skład mikrobioty nasienia i pochwy również może nie być stały i ulegać zmianom w czasie [24]. Odczyn nasienia jest lekko zasadowy, a tym samym stanowi bardziej sprzyjające środowisko dla bakterii niż pochwa, w której pH jest silnie kwaśne [38, 64]. Istnieją doniesienia wskazujące, że suplementacja bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* poprawia ruchliwość plemników i obniża poziom fragmentacji ich DNA [60].

Na skład mikrobioty nasienia wpływają między innymi wiek inicjacji seksualnej, aktualny wiek, dieta, nawyki higieniczne, zwyczaje seksualne, a także miejsce zamieszkania. Zaobserwowano, że mikrobiota nasienia wpływa na ruchliwość plemników oraz integralność ich materiału genetycznego. Należy również pamiętać o możliwości wzajemnego transferu mikroorganizmów w czasie stosunku płciowego pomiędzy partnerami. Jak już wspomniano, macica również nie jest sterylnym narządem, a modyfikacja jej mikrobioty przez nasienie może wpływać na rozwój zarodka [39, 59].

W chwili obecnej u około 45% przypadków nie udaje się ustalić etiologii nieprawidłowych parametrów nasienia. Dolna granica referencyjna dla podstawowych parametrów nasienia to: objętość nasienia – 1,5 ml, całkowita liczba plemników –  $39 \times 10^6$ /ejakulat, koncentracja plemników –  $15 \times 10^6$ /ml oraz całkowita ruchliwość plemników – 40% [26]. Być może lepsze poznanie mikrobioty nasienia i jej działania pozwoli lepiej zrozumieć przyczyny zaburzeń płodności męskiej. Niestety,

pomimo znanego wpływu mikroorganizmów na infekcje przenoszone drogą płciową, mikrobiota układu rozrodczego męskiego jest wciąż o wiele słabiej poznana, niż mikrobiota układu rozrodczego żeńskiego [46].

## 5. Rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w nasieniu

*Lactobacillus* jest bakterią, która zarówno w żeńskim, jak i męskim układzie rozrodczym jest prawidłowym składnikiem mikrobioty i stanowi fizjologiczne środowisko dla gamet. Obecnie coraz częściej uważa się, że równoczesne oznaczenie składu mikrobioty obu partnerów jest niezbędne w czasie diagnostyki przyczyn niepłodności [59].

Wang i wsp. przeprowadzili badania nad wpływem bakterii, wyizolowanych z wydzieliny pochwy, na ruchliwość plemników *in vitro*. Wszystkie bakterie posiadały zdolność adhezji do plemników, ale ze względu na dominującą ilość *Lactobacillus* w wydzielinie pochwy, to ten rodzaj stanowił przeważającą część bakterii na powierzchni plemników. Bakterie ulegające adhezji do plemników znacząco ograniczają ruchliwość gamet, co może sugerować ich ograniczający efekt na płodność męską. Autorzy konkludują, że w przypadku, gdy plemniki wykazują prawidłową morfologię i funkcje jest to ważny czynnik selekcyjny, ograniczający nieprawidłowym plemnikom (które w pewnym zakresie występują w każdym fizjologicznym ejakulacie) szanse na zapłodnienie. W przypadku spermy o nieprawidłowych parametrach adhezja bakterii do błony komórkowej plemników może znacznie utrudniać poczęcie dziecka [64].

Interesujące doświadczenie, badające wpływ mikrobioty nasienia na mikrobiotę pochwy, przeprowadzili Mändar i wsp. Od każdej pary pobrano 3 próbki materiału: próbkę nasienia, próbkę wydzieliny z pochwy przed stosunkiem i próbkę wydzieliny pochwy po stosunku. Wyniki potwierdziły, że mikrobiota nasienia charakteryzuje się większą różnorodnością i mniejszą liczebnością w stosunku do mikrobioty pochwy. Uzyskane wyniki wskazują również, że ilość bakterii z gatunku *L. crispatus* w pochwie po stosunku może ulec obniżeniu, co może być związane z alkalizacją środowiska pochwy. Ponadto może dojść do mechanicznego przeniesienia bakterii z okolicy krocza do pochwy [38].

W chwili obecnej nie jest jasne jakie mechanizmy odpowiadają za protekcyjny wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na plemniki. Jedną z możliwości jest wpływ na układ immunologiczny gospodarza. Tezę tę wydają się potwierdzać wyniki analizy parametrów nasienia u mężczyzn zdrowych i mężczyzn zarażonych wirusem HIV. U mężczyzn zakażonych wirusem HIV stwierdzono obniżoną liczbę i różnorodność bakterii w spermie. Wartości te uległy poprawie po terapii antywirusowej. U mężczyzn tych zaobserwowano również

korelację pomiędzy poziomem niektórych cytokin, a obecnością bakterii w nasieniu. Inne badania wskazują, że szczep *L. gasseri* może, poprzez indukcję ekspresji określonych genów, wywierać efekt antyoksydacyjny. Być może *Lactobacillus* stanowi nie tylko źródło aktywnych, prozdrowotnych substancji, ale wypełnia także niszę w mikrośrodku, która w przeciwnym razie zostałaby zajęta przez szkodliwe dla zdrowia mikroorganizmy. Ponadto nie do końca jest jasne, czy zmieniony skład mikrobioty nasienia powoduje zaburzenia płodności, czy nieprawidłowe środowisko męskiego układu rozrodczego i wcześniejsze zaburzenia w jego funkcjonowaniu wywołują zmiany w składzie mikrobioty [46].

Podobnie jak w przypadku mikrobioty żeńskiego układu rozrodczego dalsze badania powinny odpowiedzieć na pytania, nie tylko jakie mikroorganizmy wchodzi w skład mikrobioty nasienia, ale również jaki jest pełny skład metagenomu, transkryptomu i proteomu. Ponadto sekwencjonowanie całych metagenomów umożliwia dokładne poznanie prawidłowego składu mikrobiologicznego nasienia i jego znaczenia dla płodności męskiej [46].

## 6. Mikrobiota a niepłodność idiopatyczna

Niepłodność stała się obecnie jedną z chorób cywilizacyjnych. Problem ten dotyka około 10–16% osób w wieku rozrodczym. Szacuje się, że nawet w około 20–30% przypadków nie udaje się znaleźć przyczyny niepłodności, a stan taki nazywamy niepłodnością idiopatyczną [34, 35].

Poszukiwanie przyczyn niepłodności idiopatycznej stanowi duże wyzwanie dla naukowców i lekarzy. W obszarze ich zainteresowań znajdują się między innymi szeroko pojęte przyczyny epigenetyczne i środowiskowe. Innym kierunkiem badań nad przyczynami niepłodności jest wpływ mikrobioty układu rozrodczego żeńskiego i męskiego na płodność. Analiza tego problemu stała się możliwa między innymi dzięki dynamicznemu rozwojowi molekularnych technik diagnostycznych. Stało się to początkiem kompleksowych badań mikrobioty układu rozrodczego w całym układzie rozrodczym u obu płci. Możliwość dokładnej i szybkiej analizy genomu bakterii umożliwiła analizę wpływu poszczególnych gatunków i szczepów bakterii na płodność [58, 59].

Dotychczasowe wyniki badań na tym polu są obiecujące. Zaobserwowano, iż kobiety ze stwierdzoną niepłodnością o charakterze idiopatycznym wykazywały zmieniony skład mikrobioty pochwy w porównaniu z kobietami płodnymi. U kobiet płodnych bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* dominowały w mikrobiocie pochwy. Ponadto wykazano różne wzorce dominacji gatunków *Lactobacillus*, z przewagą *L. crispatus*, jako

markera zdrowego środowiska pochwy lub *L. iners* i *L. gasseri*, związane z mikrośrodkiem, podatnym na dysbiozę. Co ciekawe, dominacja *L. crispatus* była czynnikiem silnie związanym z powodzeniem implantacji zarodka [5, 54]. Inne badania wykazały, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sprzyjają zajściu w ciążę. Wykazano również, że obecność bakterii beztlenowych w pochwie, w tym *Atopobium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Ureaplasma* i *Escherichia* jest powiązana z patogenezą idiopatycznej niepłodności [13].

Wee i wsp. przeanalizowali próbki wymazów z pochwy, szyjki macicy i endometrium od kobiet niepłodnych i płodnych. Badanie to wykazało, że *Ureaplasma* i *Gardnerella* były bardziej obfite u niepłodnych kobiet [65]. Moreno i Simon dokonali przeglądu dotyczącego znaczenia mikrobioty endometrium dla zdrowia kobiet, ze szczególnym uwzględnieniem niepłodności. Wydaje się, że mikrobiota endometrium ma wpływ na implantację zarodka i utrzymanie ciąży. Niska liczebność *Lactobacillus* wiąże się z niepowodzeniem implantacji. Z klinicznego punktu widzenia rozpoznanie dysbiozy endometrium może stanowić nową przyczynę niepłodności kobiet [41].

W ostatnich latach uwagę skupiono na możliwym związku między mikrobiotą a niepłodnością męską. W badaniu Lundy i wsp. sprawdzono czy istnieje związek między mikrobiotą a idiopatyczną niepłodnością męską. W niniejszej pracy określono mikrobiom jelitowy, moczowy i nasienia niepłodnych mężczyzn. Okazało się, że niepłodni mężczyźni mieli zmniejszoną liczbę *Anaerococcus* w wymazach z odbytnicy i zwiększoną liczbę *Aerococcus* w nasieniu, w porównaniu z płodnymi mężczyznami. Wykazano także, że obecność *Prevotella* negatywnie wpływa na jakość plemników [33].

Nasienie ma unikalny mikrobiom, jednak jego pochodzenie i funkcja wymagają dalszych badań, aby zrozumieć jego rolę w zdrowiu i chorobach. Zmiany w składzie bakteryjnym nasienia są powiązane z różnymi zaburzeniami, w tym obniżoną płodnością i niską jakością nasienia, zapaleniem gruczołu krokowego i zakażeniem wirusem HIV. Mikrobiota nasienia może zatem wpływać na zdrowie pary [3].

Dzięki badaniom mikrobioty być może skuteczniej będzie można leczyć zaburzenia płodności, między innymi poprzez precyzyjną regulację składu mikrobioty układu rozrodczego, co może być istotne dla par z niewyjaśnioną przyczyną niepowodzeń prokreacyjnych.

## Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* a efektywność technik ART

Efektywność technik wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technology, ART), często podawana jako współczynnik uzyskanych ciąż, jest stosunkowo

niewielka i wynosi około 25–35%. Oznacza to, że tylko 25–35% kobiet zajdzie w ciążę w wyniku pierwszego transferu zarodka do macicy. Jest to wynik niezadowalający, zwłaszcza biorąc pod uwagę obciążenie fizyczne i emocjonalne pary, a także koszty finansowe. Obecnie dąży się do znalezienia czynników, wpływających na powodzenie technik wspomaganego rozrodu oraz taką ich modyfikację, by efektywność tych technik wzrosła. Znalezienie takich czynników nie jest jednak proste. Jednym z obiecujących kierunków badań jest wpływ mikrobioty układu rozrodczego kobiety i mężczyzny na uzyskanie ciąży [29, 30, 55].

Wpływ mikrobioty pochwy na powodzenie ART był badany między innymi przez Koedooder'a i wsp. W niniejszym badaniu od kobiet, leczących się z powodu niepłodności, uzyskiwano wymaz z pochwy, a następnie przeprowadzano procedurę zapłodnienia pozaustrojowego. Następnie dokonywano analizy składu mikrobiologicznego pochwy, a rezultaty zestawiano z wynikiem zapłodnienia pozaustrojowego (*in vitro* fertilization, IVF). W odniesieniu do rodzaju *Lactobacillus* autorzy zaobserwowali, że całkowita ilość tego rodzaju bakterii < 20% tworzy niesprzyjający uzyskaniu ciąży profil mikrobiologiczny pochwy. Z kolei ilość bakterii z gatunku *L. crispatus* < 60% tworzy sprzyjający uzyskaniu ciąży profil mikrobiologiczny pochwy. Te pozornie sprzeczne wyniki autorzy tłumaczą tym, że różne gatunki *Lactobacillus* mogą różnić się zdolnością do produkcji kwasu mlekowego, a tym samym zakwaszania środowiska, co stwarza środowisko niekorzystne dla innych bakterii. Przykładowo *L. crispatus* ma najwyższe zdolności zakwaszania w porównaniu z *L. iners*, *L. jensenii* oraz *L. gasseri*. Warto zaznaczyć, że niekorzystny profil mikrobiologiczny pochwy często nie daje żadnych objawów klinicznych [29].

Przedstawione dane stanowią pewnego rodzaju czynnik predykcyjny odnośnie prawdopodobieństwa uzyskania ciąży. Wyniki te można również potraktować jako wskazówkę do zmiany środowiska mikrobiologicznego pochwy przed zapłodnieniem pozaustrojowym, na przykład poprzez stosowanie odpowiednich probiotyków. Pytanie, które się nasuwa, to czy doprowadzi to do zwiększenia szansy na uzyskanie ciąży. Autorzy zastanawiają się również, czy powyższe wyniki można przenieść na prawdopodobieństwo pojawienia się ciąży, uzyskanej w sposób naturalny [29].

Powyższe obserwacje znalazły swoje potwierdzenie również w innych badaniach. Wymazy z pochwy, pobrane przed transferem zarodka, zawierały większą liczbę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* u pacjentek, u których uzyskano ciążę po IVF. U kobiet, u których nie uzyskano ciąży, stwierdzono zwiększoną liczbę m.in. bakterii rodzaju *Gardnerella* [10].

Dowiedziano również, że kobiety charakteryzujące się nieprawidłowym składem mikrobioty pochwy

wykazują około 1,4 razy mniejsze szanse na zajście w ciążę po zastosowaniu technik ART w porównaniu z kobietami z prawidłowym składem mikrobioty [53].

Badania wykazują, że aż u 19% niepłodnych kobiet diagnozowane jest bakteryjne zapalenie pochwy (bacterial vaginosis, BV). Jest to zaburzenie w ekosystemie pochwy, którego charakterystyczną cechą jest nadmierny wzrost ilości bakterii innych niż *Lactobacillus*, głównie beztlenowych, takich jak *G. vaginalis* i *Atopobium vaginae*. BV może negatywnie wpływać na kliniczny wskaźnik ciąży u pacjentek poddawanych IVF. Wykazano, że jedynie 9% pacjentek ze zdiagnozowanym BV zaszło w ciążę po zastosowaniu techniki IVF. Według Haahr i wsp. wszystkie pacjentki przed rozpoczęciem procedur IVF powinny zostać poddane badaniom w kierunku dysbiozy pochwy i w razie nieprawidłowego wyniku, powinny zostać poddane leczeniu [22].

Reasumując, obecność specyficznych *Lactobacilli* i wiązana z tym właściwa wartość pH wydaje się być czynnikiem niezwykle istotnym w utrzymaniu homeostazy pochwy i uzyskaniu pozytywnych wyników IVF. Obecność bakterii z gatunku *G. vaginalis* i *Ureaplasma* sp. prowadzi do dysbiozy pochwy i niepowodzeń w technikach wspomaganego rozrodu [20, 52].

Nowym i niezwykle interesującym zagadnieniem jest badanie wpływu mikrobioty macicy na powodzenie ART. Obecnie trwają próby określenia prawidłowego składu mikrobioty macicy i oceny jego wpływu na płodność. Stwierdzono, że brak dominacji *Lactobacillus* i przerost *Gardnerella*, *Atopobium* i *Prevotella* mają silny związek z niepowodzeniem IVF. Przywrócenie korzystnej mikrobioty macicy, zdominowanej przez *Lactobacillus*, może poprawić wyniki reprodukcyjne [12, 19, 20, 31].

W jednym z badań opisano mikrobiotę endometrium jako zdominowaną przez *Lactobacillus* (*Lactobacillus* dominated microbiota, LDM) lub niezdominowaną przez *Lactobacillus* (*non Lactobacillus* dominated microbiota, NLDM). Wyniki tego badania nie udowadniają jednoznacznie korzyści z dominacji *Lactobacillus* w endometrium w odniesieniu do liczby uzyskanych ciąż. Sugeruje się jednak, że endometrium zdominowane przez *Lactobacillus* może korzystnie wpływać na proces implantacji. Badania takie mają istotne znaczenie w określeniu prawidłowego i nieprawidłowego składu mikrobiologicznego endometrium [32].

Nie można również zapomnieć o roli nasienia w ART. Jak opisano powyżej, nasienie nie jest sterylne i co więcej, może zawierać mikroorganizmy nawet po procedurach przygotowujących spermę do zapłodnienia pozaustrojowego. W przypadku technik wspomaganego rozrodu może to mieć szczególne znaczenie, ponieważ procedury te omijają naturalne mechanizmy obronne, działające w drogach rozrodczych żeńskich. Zagrożenie to próbuje się zminimalizować poprzez



specjalne przygotowanie nasienia oraz dodatek antybiotyków do odczynników używanych w technikach ART. Niejasne jest jednak, jak powszechne jest występowanie bakterii w nasieniu, używanym w technikach ART, jaka jest ilość tych bakterii ani jak one wpływają na powodzenie zapłodnienia pozaustrojowego [55].

Wyniki badań przeprowadzone przez Štšeptovą i wsp. potwierdziły, że zarówno nasienie, jak i odczynniki używane do procedur ART zawierają bakterie. Najliczniej występującą bakterią w pobranym nasieniu oraz w medium do przeprowadzania procedury zapłodnienia *in vitro* był *Lactobacillus*. Rezultaty tych obserwacji wskazują, że zapłodnienie w warunkach *in vitro* nie zachodzi w sterylnym środowisku a także, że obecność takich bakterii jak *Staphylococcus* i *Alphaproteobacteria* koreluje z jakością nasienia i embrionu [55].

## 7. Podsumowanie

Najbardziej rozpowszechnioną bakterią, występującą w stanie fizjologicznym, zarówno w żeńskim, jak i męskim układzie rozrodczym, są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Ich protekcyjna rola w utrzymaniu płodności jest lepiej poznana u kobiet, niż u mężczyzn, jednak mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko są nadal słabo poznane. Zbadanie i zrozumienie tych mechanizmów ma szczególne znaczenie, zwłaszcza obecnie, kiedy zaburzenia płodności są coraz powszechniejszym problemem zdrowotnym, a nie zawsze ich przyczyna zostaje zdiagnozowana. Rola i wpływ pozostałych bakterii mikrobioty, obecnych w drogach rozrodczych, na płodność znajduje się na etapie badań. Ponadto coraz więcej doniesień wskazuje na możliwość wzajemnej interakcji pomiędzy mikrobiotą żeńską a męską, a jej wpływ na zdrowie reprodukcyjne pozostaje nieznane. Być może regulacja składu środowiska mikrobiologicznego układu rozrodczego przyjdzie z pomocą w uzyskaniu ciąży. Wyjaśnienie tych zagadnień może w niektórych przypadkach umożliwić wybór odpowiedniej terapii i zwiększyć szanse na uzyskanie potomstwa, również w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego.

## Piśmiennictwo:

- Aldunate M., Tyssen D., Johnson A., Zakir T., Sonza S., Moench T., Cone R., Tachedjian G.: Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2015–2025 (2013)
- Alfano M., Salonia A. i wsp.: Testicular microbiome in azoospermic men—first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum. Reprod.* **33**, 1212–1217 (2018)
- Altmäe S., Franasiak J.M., Mändar R.: The seminal microbiome in health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **16**, 703–721 (2019)
- Amabebe E., Anumba DOC.: The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Front. Med.* doi:10.3389/fmed.2018.00181 (2018)
- Amato V., Mancini N. i wsp.: 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. *Open Forum Infect. Dis.* doi:10.1093/ofid/ofz525 (2020)
- Anahar M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., Kwon D.S.: Cervicovaginal microbiota and reproductive health: The virtue of simplicity. *Cell Host Microbe.* **23**, 159–168 (2018)
- Aroutcheva A., Gariti D., Simon M., Shott S., Faro J., Simoes J.A., Gurguis A., Faro S.: Defense factors of vaginal Lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **185**, 375–379 (2001)
- Baud D., Pattaroni C., Vulliemoz N., Castella V., Marsland B.J., Stojanov M.: Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2019.00234 (2019)
- Benner M., Ferwerda G., Joosten I., van der Molen R.G.: How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum. Reprod. Update.* **24**, 393–415 (2018)
- Bernabeu A., Bernabeu R. i wsp.: Effect of the vaginal microbiome on the pregnancy rate in women receiving assisted reproductive treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* **36**, 2111–2119 (2019)
- Bracewell-Milnes T., Saso S., Nikolaou D., Norman-Taylor J., Johnson M., Thum MY.: Investigating the effect of an abnormal cervico-vaginal and endometrial microbiome on assisted reproductive technologies: A systematic review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **80**, e13037 (2018)
- Brandão P., Gonçalves-Henriques M.: The impact of female genital microbiota on fertility and assisted reproductive treatments. *J. Fam. Reprod. Health.* **14**, 131–149 (2020)
- Campisciano G., Florian F., D'Eustacchio A., Stanković D., Ricci G., De Seta F., Comar M.: Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1681–1688 (2017)
- Chen C., Jia H. i wsp.: The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat. Commun.* doi: 10.1038/s41467-017-00901-0 (2017)
- Deplanche M., Berkova N. i wsp.: Staphylococcus aureus induces DNA damage in host cell. *Sci. Rep.* doi:10.1038/s41598-019-44213-3 (2019)
- Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J.W., Jayasena C.N., Minhas S.: The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology.* doi: 10.1111/andr.12886 (2020)
- France MT, Mendes-Soares H, Forney LJ. Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Appl. Environ. Microbiol.* **21**, 24: 7063–7073 (2016)
- Gajer P., Ravel J.: Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med.* **4**, 132ra52 (2012)
- Garcia-Grau I., Perez-Villaroya D., Bau D., Gonzalez-Monfort M., Vilella F., Moreno I., Simon C.: Taxonomical and functional assessment of the endometrial microbiota in a context of recurrent reproductive failure: A case report. *Pathogens*, **8**, 205 (2019)
- García-Velasco J.A., Budding D., Campe H., Malfertheiner S.F., Hamamah S., Santjohanser C., Schuppe-Koistinen I., Nielsen H.S., Vieira-Silva S., Laven J.: The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod. Biomed.* **41**, 443–453 (2020)
- Gerstner, G.J., Grünberger, W., Boschitsch, E., Rotter M.: Vaginal organisms in prepubertal children with and without vulvovaginitis. *Arch. Gynecol.* **231**, 247–252 (1982)

22. Haahr T., Jensen J.S., Thomsen L., Duus L., Rygaard K., Humaidan P.: Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Human Reprod.* **31**, 795–803 (2016)
23. Hammerschlag M.R., Alpert S., Rosner I. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics.* **62** 57–62 (1978)
24. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M. L., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C.: Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil. Steril.* **100**, 1261–1269 (2013)
25. Javurek, A.B., Spollen W.G., Ali A.M., Johnson S.A., Lubahn D.B., Bivens N.J., Bromert K.H., Ellersieck M.R., Givan, S.A., Rosenfeld C.S.: Discovery of a novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor alpha genetic status. *Sci. Rep.* **6**, 23027 (2016)
26. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G. R., Giwercman B. A., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. „Rekomendacje dotyczące postępowania w męskiej niepłodności”, *Post. Androl.* **3**, 17–54 (2016)
27. Kacerovsky M., Vrbacky F., Kutova R., Pliskova L., Andrys C., Musilova I., Menon R., Lamont R., Nekvindova J.: Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One*, **10**, e0126884 (2015)
28. Karaoğlu Ş.: Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal *Lactobacilli*. *Turk. J. Med. Sci.* **33**, 7–13 (2003)
29. Koedooder R., Laven J.S.E. i wsp.: The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum. Reprod.* **34**, 1042–1054 (2019)
30. Koedooder R., Mackens S., Budding A., Fares D., Blockeel C., Laven J., Schoenmakers S.: Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum. Reprod.* **25**, 298–325 (2019)
31. Kong Y., Liu Z., Shang Q., Gao Y., Li X., Zheng C., Deng X., Chen T.: The disordered vaginal microbiota is a potential indicator for a higher failure of invitro fertilization. *Front. Med.* **7**, 217 (2020)
32. Kyono K., Hashimoto T., Kikuchi S., Nagai Y., Sakuraba Y.: A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium. *Reprod. Med. Biol.* **18**, 72–82 (2018)
33. Lundy S., Eng C.: Functional and taxonomic dysbiosis of the gut, urine, and semen microbiome in male infertility. *Fert. Steril.* **114**, e94 (2020)
34. Łepecka-Klusek C., Pilewska-Kozak A.B., Jakiel G.: Niepłodność w świetle definicji choroby podanej przez WHO, *Med. Og. Nauk. Zdr.* **18**, 163–166 (2012)
35. Łukaszuk K., Wołczyński S. i wsp.: (2018) Diagnostyka i leczenie niepłodności – rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRIE) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGP). *GiPP*, **3**, 112–140 (2018)
36. Macura B., Majewska-Szczepanik M., Strzępa A., Szczepanik M.: Wpływ mikrobioty macicy na zdrowie kobiety i jej potomstwa. *Med. Og. Nauk. Zdr.* **26**, 230–239 (2020)
37. Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res.* **69**, 32–41 (2013)
38. Mändar R., Truu J. i wsp.: Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Res. Microbiol.* **166**, 440–447 (2015)
39. Mändar R., Türk S., Korrovits P., Ausmees K., Punab M.: Impact of sexual debut on culturable human seminal microbiota. *Andrology*, **6**, 510–512 (2018)
40. Moreno I., Garcia-Grau I., Bau D., Perez-Villaroya D., Gonzalez-Monfort M., Vilella F., Romero R., Simón C.: The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **222**, 296–305 (2020)
41. Moreno, I.; Simon, C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertil. Steril.* **110**, 337–343 (2018)
42. Moreno I., Simon C.: Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reprod. Med. Biol.* **18**, 40–50 (2018)
43. Nardini P., Ñahui Palomino R.A., Parolin C., Laghi L., Foschi C., Cevenini R., Vitali B., Marangoni A.: *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro study. *Sci. Rep.* **6**, 29024 (2016)
44. Nunn K.L., Forney L.J.: Unraveling the dynamics of the human vaginal microbiome. *Yale J. Biol. Med.* **9**, 331–337 (2016)
45. Nuriel-Ohayon M., Neuman H., Koren O.: Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front. Microbiol.* **7**, 1031 (2016)
46. Osadchiv V., Mills J. N., Mayer E. A., Eleswarapu S. V.: The seminal microbiome and male factor infertility. *Curr. Sex. Health Rep.* **12**, 202–207 (2020)
47. Petricevic L., Domig K.J., Nierscher F.J., Sandhofer M.J., Fideser M., Krondorfer I., Husslein P., Kneifel W., Kiss H.: Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. *Sci. Rep.* **4**, 5136 (2014)
48. Petrova M.I., Lievens E., Malik S., Imholz N., Lebeer S.: *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* **6**, 81 (2015)
49. Petrova M.I., Reid G., Vanechoutte M., Lebeer S.: *Lactobacillus* inners: Friend or Foe? *Trends Microbiol.* **25**, 182–191 (2017)
50. Pytka M., Kordowska-Wiater M., Jarocki P.: Mikrobiom układu płciowego kobiet. *Post. Mikrobiol.* **58**, 227–236 (2019)
51. Ravel J., Forney L.J. i wsp.: Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4680–4687 (2011)
52. Schoenmakers S., Laven J.: The vaginal microbiome as a tool to predict IVF success. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **32**, 169–178 (2020)
53. Singer M., Borg M., Ouburg S., Morré S.A.: The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment-A meta-analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **48**, 223–229 (2019)
54. Stone L.: Infection: Vaginal microbiota and infectious infertility. *Nat Rev Urol.* **15**, 136 (2018)
55. Štšepetova J.A., Mändar R.: The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **18**, 3 (2020)
56. Swanson G.M., Moskovtsev S., Librach C., Pilsner J.R., Goodrich R., Stephen A., Krawetz S.A.: What human sperm RNA-Seq tells us about the microbiome. *J. Assist. Reprod. Genet.* **37**, 359–368 (2020)
57. Tachedjian G., O’Hanlon D.E., Ravel J.: The implausible „in vivo” role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota. *Microbiome*, **6**, 29 (2018)
58. Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D’Argenio V.: Microbiota and human reproduction: the case of female infertility. *High Throughput*, **9**, 12 (2020)
59. Tomaiuolo R., Veneruso I., Cariati F., D’Argenio V.: Microbiota and human reproduction: the case of male infertility. *High Throughput*, **9**, 10 (2020)
60. Valcarce D.G., Genovés S., Riesco M.F., Martorell P., Herráez M.P., Ramón D., Robles V.: Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors. *Benef. Microbes*, **8**, 193–206 (2017)
61. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P.: Role of *Lactobacilli*



- and *Lactoferrin* in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Front. Immunol.* **9**, 376 (2018)
62. Vallor A.C., Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.L.: Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal *Lactobacilli*: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis.* **184**, 1431–1436 (2001)
63. Verstraelen H., Vilchez-Vargas R., Desimpel F., Jauregui R., Vankeirsbilck N., Weyers S., Verhelst R., De Sutter P., Pieper D.H., Van De Wiele T.: Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *Peer J.* **4**, e1602 (2016)
64. Wang H., Chen T., Chen Y., Luo T., Tan B., Chen H., Xin H.: Evaluation of the inhibitory effects of vaginal microorganisms on sperm motility invitro. *Exp. Ther. Med.* **19**, 535–544 (2020)
65. Wee, B.A., Huston W.M. i wsp.: A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *J. Obstet. Gynaecol.* **58**, 341–348 (2018)
66. Weng S.L., Huang H.D. i wsp.: Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* **9**, e110152 (2014)
67. Witkin S.S., Linhares I.M.: Why do *Lactobacilli* dominate the human vaginal microbiota? *BJOG*, **124**, 606–611 (2017)
68. Zheng J., Lebeer S.A. i wsp.: Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 2782–2858 (2020)