



Сравнительный анализ микробиоты ткани яичка и уретры у пациентов с азооспермией методом секвенирования нового поколения (NGS)

М.В. Фаниев¹, Я.В. Прокопьев², К.В. Фаустова², З.А. Кадыров¹, Д.И. Водолажский³, М.И. Маркелова⁴, Д.Р. Хуснутдинова⁴, Т.В. Григорьева⁴, Г.В. Черепнев²

¹ ФНМО МИ РУДН, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

² КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Муштары, 11

³ ЦНИЛ медицинской академии имени С.И. Георгиевского при КФУ имени В.И. Вернадского, 295006, Россия, Республика Крым, Симферополь, б-р Ленина, 5/7.

⁴ ФГАОУ ВО КФУ, Институт фундаментальной медицины и биологии, 420008, г. Казань, ул. Парижской Коммуны, 9

Контакты: Михаил Владимирович Фаниев, faniev.mv@gmail.ru

Цель исследования. Определить роль таксономического бактериального разнообразия микробиоты уретры и тестикулярной ткани в развитии мужской infertility с применением метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

Материалы и методы. За период с 2018 по 2022 г. нами обследовано 53 пациента, которые были распределены по следующим группам: infertile пациенты с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле (n = 13) – группа 1; infertile пациенты с обструктивной азооспермией (n = 29) – группа 2; фертильные пациенты с подтвержденным отцовством и патологией яичка, требующей гистологической верификации с целью исключения онкопатологии яичек (n = 11) – группа 3. Каждому пациенту была выполнена TESE с забором тестикулярной ткани и ткани уретры с целью сравнения бактериального пейзажа и контроля чистоты метода. Полученный материал был взят для последующего секвенирования с использованием высокопроизводительного метода (NGS).

Результаты. При проведении статистического анализа в исследуемых группах было установлено, что тестикулярная ткань бесплодных пациентов с обструктивной азооспермией имеет значительно обедненное бактериальное разнообразие по сравнению с группой пациентов с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле. В свою очередь, группа фертильных мужчин является самой разнообразной по своему таксономическому сообществу, что может служить поводом предположить о влиянии микробиома на репродуктивное здоровье.

Обсуждение. Проведенный нами анализ бактериального разнообразия микробиома яичек и уретры у трех групп пациентов показал, что тестикулярная ткань человека не является микробиологически стерильной средой, а также представил новые данные, ассоциированные с тканями яичка, о возможной взаимосвязи мужского бесплодия с тестикулярным микробиомом.

Выводы. Ориентир на качественный и количественный состав тестикулярного микробного сообщества может лечь в основу нового подхода в диагностике и лечении мужского бесплодия, ассоциированного с различными видами азооспермии.

Ключевые слова: микробиом, микробиота, тестикулярная ткань, азооспермия, секвенирование, геном.



Comparative analysis of the testicular and uretral microbiota in azoospermia patients using next generation sequencing (NGS)

M.V. Faniev¹, Ya.V. Prokopiev², K.V. Faustova², Z.A. Kadyrov¹, D.I. Vodolazhsky³, M.I. Markelova⁴, D.R. Husnutdinova⁴, T.V. Grigoryeva⁴, G.V. Cherepnev²

¹RUDN University. Moscow, Russia

²Kazan State Medical Academy. Kazan, Russia

³Crimean Federal University. Simferopol, Russia

⁴Kazan Federal University. Kazan, Russia

Contacts: Mikhail Vladimirovich Faniev, faniev.mv@gmail.ru

Aim. To determine the role of taxonomic bacterial diversity of the urethral and testicular microbiota in the development of male infertility using high-throughput next-generation sequencing (NGS).

Material and methods. In the period between 2018 and 2022 we examined 53 patients. Three study groups were formed: Infertile patients with nonobstructive azoospermia and concomitant varicocele (n = 13) – group 1; Infertile patients with obstructive azoospermia (n = 29) – group 2; Fertile patients with confirmed paternity and testicular pathology requiring histological verification to exclude testicular oncopathology (n = 11) – group 3. Each patient underwent TESE with testicular both and urethral tissue sampling in order to compare the bacterial landscape and control the purity of the method. The obtained material was sequenced using a high-throughput method (NGS).

Results. According to our findings, the testicular tissue of obstructive azoospermia patients had significantly depleted bacterial diversity in comparison to nonobstructive azoospermia and concomitant varicocele ones. Also, the fertile group turned out to be the most diverse in its taxonomic community. These results may suggest the bacterial microbiome's influence on men's reproductive health.

Discussion. Our urogenital bacterial diversity analysis showed that human testicular tissue is not a microbiologically sterile environment and also presented new data associated with testicular tissue and its possible relations with male infertility.

Conclusion. A focus on the qualitative and quantitative composition of the testicular microbial community may form the new basis in the diagnosis and treatment of male infertility associated with various types of azoospermia

Keywords: microbiome, microbiota, testicular tissue, azoospermia, sequencing, genome, male infertility.

Введение

В настоящее время, на наш взгляд, мы имеем недостаточное количество надежных методик в рутинной практике врача-уролога для определения мужского бесплодия, основываясь на применении достижений молекулярной биологии и генетики. Однако анализ экспрессии генов, в частности, не только самих клеток человека, но и бактериальной ДНК микроорганизмов, колонизирующих его, занимает особое место в прогнозе стратегий лечения инфертильных пациентов [1, 2, 3]. Микробиота уrogenитального тракта на сегодня изучена плохо и до сих пор остается предметом дискуссий и исследований, ведь ее роль сложна и многогранна [4, 5]. Имеет место лишь гипотеза ее антагонизма патогенной микрофлоре [6]. Как и в других областях организма, бактерии мочевыводящих путей влияют на анатомические и физиологические

характеристики местных тканей, которые они колонизируют, участвуют в регуляции важных витальных функций, в том числе и репродуктивной [7]. Это, в свою очередь, может сыграть ключевую роль в вопросах сохранения и восстановления фертильности, которые сегодня стоят особенно остро [8]. Возвращаясь в контекст микробиома, следует отметить, что не остается без внимания и уrogenитальный тракт инфертильных пациентов, ведь согласно статистике доля инфертильных мужчин составляет 20%, из которых до 1% случаев приходится на азооспермию – полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте [9].

Актуальные клинические рекомендации российских и европейских научных сообществ определяют диагностический стандарт в плане подготовки к использованию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для мужчин только культуральным



анализом эякулята [10, 11]. Данная позиция, безусловно, ограничена, но ограничена она не чем иным, как отсутствием серьезной доказательной базы о наличии и верификации микроорганизмов, не попавших в культуральный срез диагностики и, как следствие, в клинические рекомендации. Сложность ситуации еще и в том, что традиционными методами мы способны выявлять менее 2% известных штаммов бактерий [12–14]. Так, достоверно известно, что культуральный метод не позволяет в полной мере идентифицировать микробный пейзаж органов УГТ, где содержатся некультивируемые микроорганизмы, в том числе лактобактерии [15–17]. Соответственно, сегодня в мировом научном сообществе нет единого мнения о связи микробиоты с репродуктивным здоровьем мужчин, учитывая неоднородность и достаточно небольшое количество имеющейся информации по данной теме [18, 19]. Однако появление геномного секвенирования уже позволило описать значительную часть человеческого микробиома [20], включая микробиом дыхательных путей, кожи, ротовой полости, кишечника и, конечно, органов урогенитального тракта [21, 22].

Цель

Определить роль таксономического бактериального разнообразия микробиоты уретры и тестикулярной ткани в развитии мужской infertility с применением метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

Материалы и методы

Нами произведен анализ 53 парных образцов (микробиота уретры и ткани яичка) методом высокопроизводительного секвенирования. Для проведения исследования было отобрано 42 пациента с обструктивной и необструктивной азооспермией с сопутствующим варикоцеле [23] по строгим критериям включения: подписание добровольного информированного согласия на участие, возраст старше 18 лет, бесплодный брак более 1 года при условии регулярной половой жизни без использования средств контрацепции, отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, их гипоплазии, онкологической патологии, а также отсутствие антибактериальной терапии в течение трех месяцев. В свою очередь, критериями исключения явились: наличие онкологической патологии, ИППП, генетические факторы бесплодия, тяжелая сопутствующая патология на момент обследования, регулярный прием лекарственных средств, приводящих к развитию бесплодия и гипогонадизма, повышение концентрации PSA в сыворотке крови более 4 нг/мл и/или его свободной фракции более 5 нг/мл, психические заболевания,

хронический алкоголизм и наркомания, наличие ВИЧ-инфекции. Также в исследование были включены 11 фертильных пациентов с подтвержденным отцовством, но требующих патогистологического исследования яичка, с целью исключения герминогенных опухолей. Данное распределение по группам обусловлено разделением двух различных форм азооспермии, где в первой группе имеет место нарушение гематотестикулярного барьера в сравнении с варикоцеле, вследствие с группой обструктивной азооспермией, а также с третьей группой фертильных пациентов. Таким образом, все пациенты были разделены на 3 группы: infertile пациенты с необструктивной азооспермией и сопутствующим варикоцеле ($n = 13$) – группа 1; infertile пациенты с обструктивной азооспермией ($n = 29$) – группа 2; фертильные пациенты с подтвержденным отцовством и патологией яичка, требующей гистологической верификации ($n = 11$) – группа 3.

После проведения биопсии полученный материал был отправлен не только на рутинное ПГИ, но также взят для последующего секвенирования с использованием высокопроизводительного метода (NGS). Также для сравнения бактериального пейзажа урогенитального тракта и контроля чистоты метода был произведен забор биологического материала из уретры у каждого пациента, которому проводилась биопсия яичка.

Наиболее сложным этапом подготовки к проведению секвенирования явилась процедура выделения бактериальной ДНК. В этом контексте нами была разработана и выполнена методика выделения бактериальной ДНК из биоптата яичка для определения тестикулярного микробиома у infertile пациентов. Далее следовала процедура секвенирования и последующий статистический анализ результатов.

Результаты

По завершении проведения высокопроизводительного секвенирования микробиомы яичка и уретры по группам представляли бактериальные пейзажи с преобладанием определенных микробных сообществ (рис. 1).

Полученные в процессе секвенирования последовательности гена 16S рРНК (риды) были проанализированы с помощью ПО QIIME (версия 1.9.1) [20]. При проведении сравнения встречаемости видов бактерий, которые были выявлены и в уретре, и в биоптате яичка хотя бы у одного пациента, было установлено: в группе 1 по сравнению с другими достоверно чаще обнаруживаются неопределенные представители семейств Enterobacteriaceae и Xanthomonadaceae, родов Finegoldia, Bifidobacterium, Porphyromonas,

Prevotella, *Peptoniphilus* и *Pseudomonas*. В группе фертильных пациентов по сравнению с группой 2 достоверно чаще обнаруживается неопределенный представитель рода *Bifidobacterium*. В группе 1 по сравнению с группой 3 достоверно чаще обнаруживается неопределенный представитель семейства *Enterobacteriaceae*. Однако данная ситуация обусловлена тем, что в группе 2 в среднем около 35% составляют представители *Enterobacteriaceae* и данный таксон не отличается достоверно от других номинантов, но суммарно определяет большой процент за счет того, что в нескольких образцах составляет около 95% от всей общей микробиоты, что было подтверждено при дальнейшем корреляционном анализе.

Группа фертильных пациентов занимает промежуточное положение по разнообразию бактериальных сообществ уретры: индексы филогенетического разнообразия и Chao1 , а также общее количество обнаруженных операционных таксономических единиц (ОТЕ) в группе 2 достоверно ниже, чем в группе у пациентов с варикоцеле и необструктивной азооспермией. Таким образом, в группе 2 бактериальное сообщество уретры выглядело как более обедненное. Для выявления таксономического разнообразия микробиоты ткани яичка пациентов из исследуемых групп был проведен сравнительный

анализ представленности обнаруженных видов с использованием критерия Краскела — Уоллиса с поправкой на множественное сравнение методом Бенджамини — Хохберга. Также была произведена оценка альфа-разнообразия исследуемых бактериальных сообществ яичка. Выявлено, что индексы филогенетического разнообразия, Chao1 , Шеннона и Симпсона, а также общее количество обнаруженных таксономических единиц (ОТЕ) в группе 2 достоверно ниже, чем в группах 1 и 3. В результате чего выявлено, что в группе 2 бактериальное сообщество ткани яичка также характеризуется меньшим разнообразием представленных филов и ридов, что говорит о более бедном сообществе тестикулярного микробиома (рис. 2).

Обсуждение

Проведенный нами анализ бактериального разнообразия микробиома яичек и уретры у трех групп пациентов показал, что тестикулярная ткань человека не является микробиологически стерильной средой, а также представил новые данные, ассоциированные с тканями яичка, и показал разнообразие микробиологической палитры у групп инфертильных пациентов с различными видами азооспермии. Как видно при сравнении групп бесплодных и фертильных мужчин, последние имеют широкое бактериальное

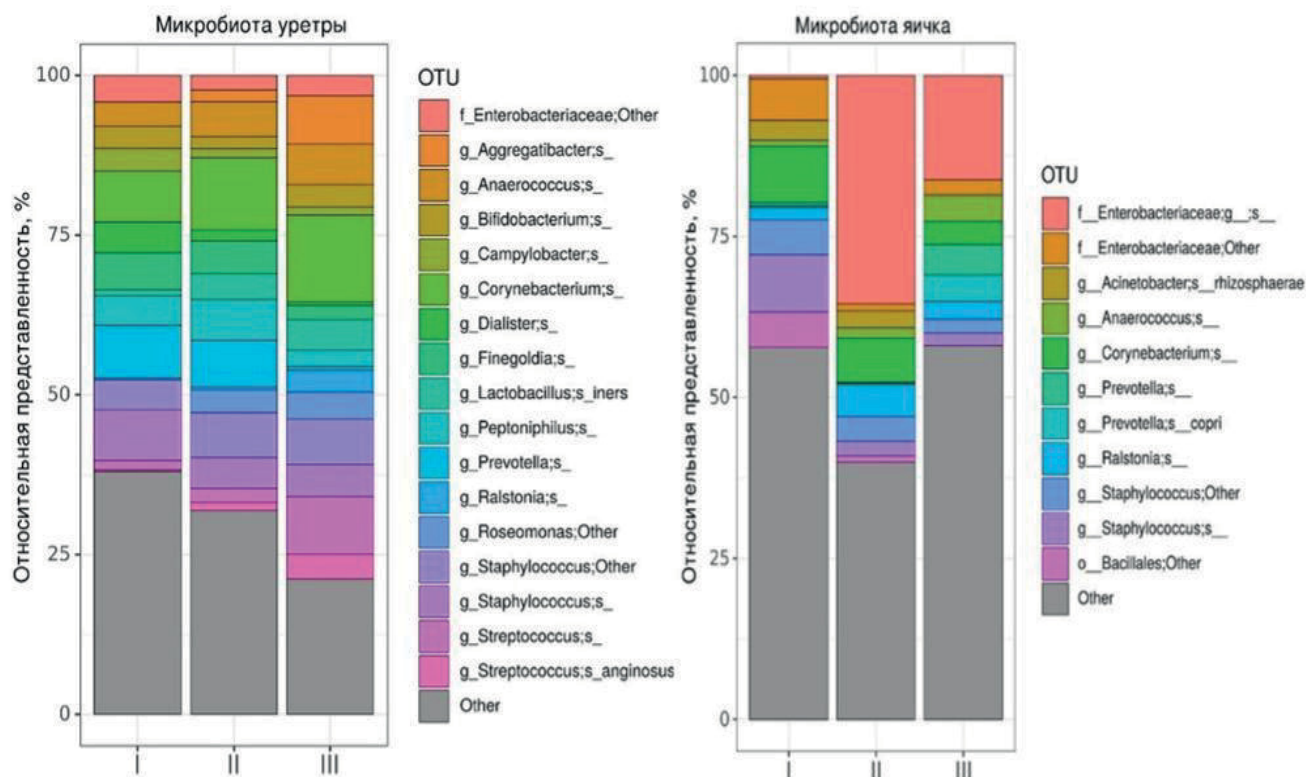


Рисунок 1. Наиболее представленные виды микробиоты уретры (слева) и яичек (справа) в группах сравнения

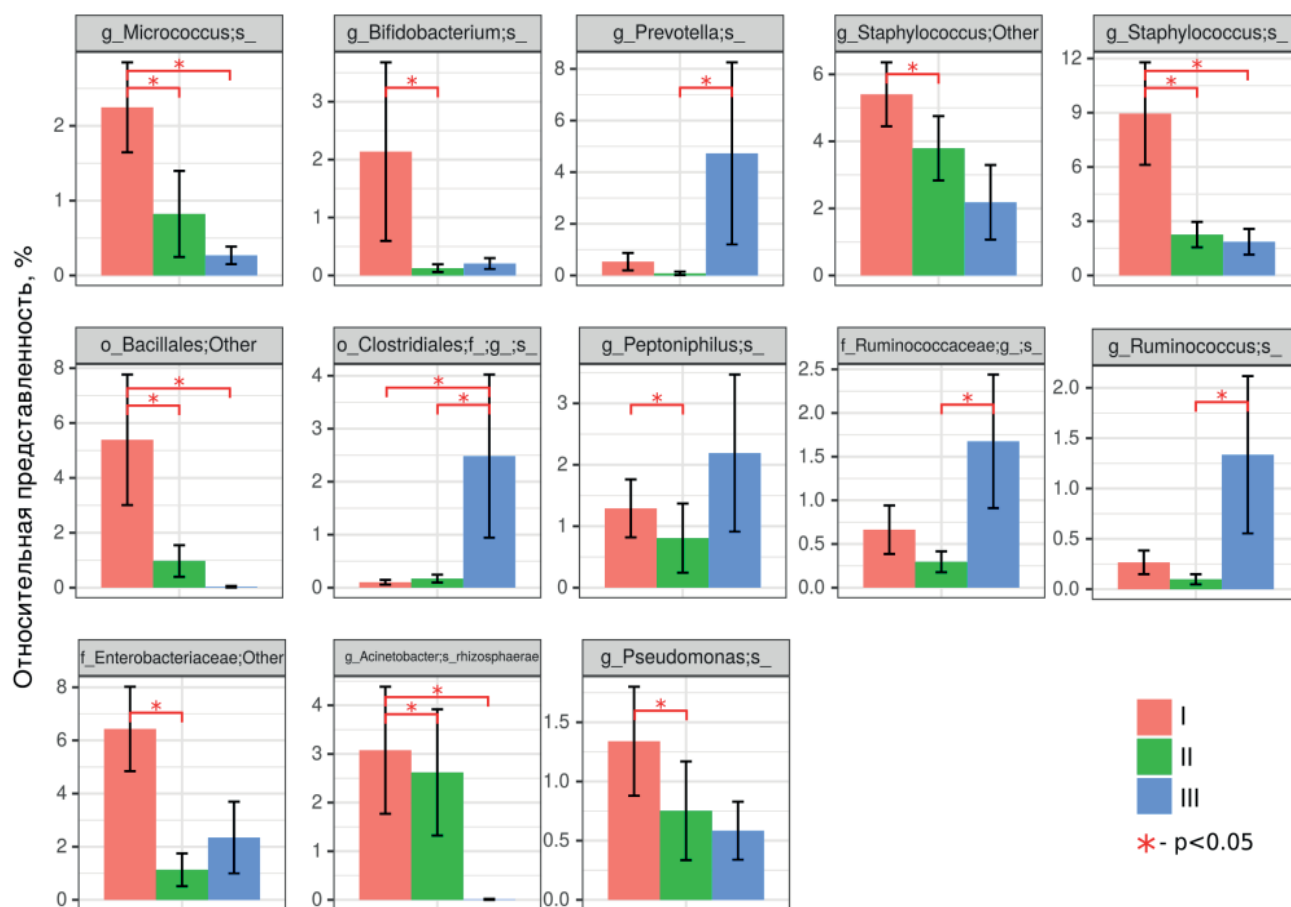


Рисунок 2. Статистически значимо отличающиеся между группами сравнения виды, обнаруженные в микробиоте ткани яичка

разнообразие, в то же время 1 и 2 обеднены как качественно, так и количественно. Таким образом, согласно результатам нашего исследования можно смело предположить, что, помимо широко известных факторов развития бесплодия, микробиом яичка занимает особое положение и может влиять на репродуктивное здоровье, что подтверждается актуальными научными работами в мировом сообществе и требует дальнейшего исследования.

Выводы

Наше исследование – одно из первых в России, где подчеркивается, что тестикулярные ткани пациентов с диагнозом «мужское бесплодие» содержат ассоциированные с тканями комменсальные бактерии. Необходимы более масштабные исследования, чтобы подтвердить наши предварительные предположения о том, что ткани яичка и уретры не являются микробиологически стерильной средой. Яички и уретральная ткань инфертильных мужчин содержат дисбактериальное сообщество микроорганизмов, качественно и количественно отличное

от такового у фертильных пациентов, и имеют менее разнообразный микробный пейзаж инфертильной тестикулярной ткани, что может быть связано с иммунным ответом, характерным для урогенитального тракта, в частности с особенностями гематотестикулярного барьера. И конечно, особого внимания ученых достойны такие современные методики диверсификации микробиома, как высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS). Разработка принципиально новой стратегии и тактики скрининга мужской инфертильности на основе молекулярных инструментов представляет собой насущную потребность на сегодняшний день. И, подводя итог, хочется отдельно отметить предложенный нами способ выделения бактериальной ДНК тестикулярного микробиома, который позволит значительно сократить трудоемкость, совершенствовать прогнозирование результатов диагностики репродуктивного потенциала и обоснованность программы выбора алгоритма лечения и повышения медико-социальной реабилитации.



Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Kulchenko N.G., Myandina G.I., Alhejoj H., Azova M.M., Tarasenko E.V. Association of glutathione S-transferase gene polymorphism with risk of male infertility in Moscow. *Urologiia*. 2021;2:69–73. DOI:10.18565/urology.2021.2.69-73
2. Myandina G. I., Kulchenko N. G., Alhejoj H. The frequency of polymorphism –262 c>t cat gene of infertile men in the moscow region. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(3):478–481. DOI: 10.14300/mnnc.2019.14116
3. Myandina G. I., Kulchenko N. G., Alhejoj H. Polymorphism G-105A SEPS1 gene and mens' infertility. *Medical News of North Caucasus*. 2018;13(3):488–490. DOI: 10.14300/mnnc.2018.13085
4. Santacrose L et al. Testicular Immunity and Its Connection with the Microbiota. *Physiological and Clinical Implications in the Light of Personalized Medicine*. *J Pers Med*. 2022 Aug 20;12(8):1335. doi: 10.3390/jpm12081335
5. Sherwood L. et al. *Prescott's Microbiology* (9th ed.). 2013; New York: McGraw Hill. pp. 713–721. ISBN 9780073402406. OCLC 886600661
6. Marchesi J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015; 3:31. PMID: 26229597. DOI:10.1186/s40168-015-0094-5
7. Pasolli E. et al. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography and Lifestyle. *Cell*. 2019; 176 (3):649–662. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.001
8. Ventimiglia E et al. Extensive Assessment of Underlying Etiological Factors in Primary Infertile Men Reduces the Proportion of Men with Idiopathic Infertility. *Front Endocrinol*. 2021;12. DOI: 10.3389/fendo.2021.801125.
9. Barratt CLR et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1;23(6):660–680. doi: 10.1093/humupd/dmx021. PMID: 28981651; PMCID: PMC5850791.
10. European Association of Urology. EAU guidelines on male infertility. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf>. Accessed May 2, 2019
11. Урология. Российские клинические рекомендации. Под ред. Ю.Г. Аляева, П.В. Глыбочко, Д.Ю. Пушкаря. М.: Медфорум, 2018. 544 с.
12. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition. Geneva: World Health Organization; 2021
13. Lundy S. et al. Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. *Eur Urol*. 2021 Jun;79(6):826–836
14. Sender R., Fuchs S., Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016; 164 (3): 337–40. PMID: 26824647. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.013
15. Почерников, Д. Г., Галкина, И. С., Постовойтенко, Н. Т., Герасимов, А.М. Сравнительный анализ биотопа эякулята и цервикального канала методом ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» в супружеских парах // *Вестник РГМУ*. 2017. №2. С. 37–41. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-05
16. Ворошилина, Е.С., Зорников, Д.Л., Иванов, А.В., Почерников, Д.Г., Паначева, Е.А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ // *Вестник РГМУ*. 2020. №5. С. 66–73. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.06410.
17. Почерников, Д. Г., Постовойтенко, Н. Т., Гетьман, В. В., Галкина, И. С. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus spp.* в эякуляте // *Вестник РГМУ*. 2020. №3. С. 42–48. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.039
18. Boitrelle F. et al. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel)*. 2021;11(12):1368. DOI:10.3390/life11121368.
19. Doroftei B, Ilie OD, Dabuleanu AM, Hutanu D, Vaduva CC. A Retrospective Narrative Mini-Review Regarding the Seminal Microbiota in Infertile Male. *Medicina* 2022 Aug 7;58(8):1067. DOI: 10.3390/medicina58081067. PMID: 36013533; PMCID: PMC9414835
20. Quigley E.M. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2013; 9 (9): 560–9. PMID 24729765
21. Alfano M. et al. Testicular microbiome in azoospermic men—first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum Reprod*. 2018 Jul 1;33(7):1212–1217. DOI:10.1093/humrep/dey116.
22. Chen H, Luo T, Chen T, Wang G. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. *Exp Ther Med*. 2018 Mar;15(3):2884–2890. doi: 10.3892/etm.2018.5778. Epub 2018 Jan 19.
23. Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature methods*. — 2010. — Т. 7. — №. 5. — С. 335–336.



Вклад авторов

Фаниев Михаил Владимирович: концепция и дизайн исследования, написание текста, 35%.

Прокопьев Ярослав Валерьевич: сбор данных, анализ данных, 15%.

Фаустова Карина Валерьевна: сбор данных, анализ данных, 5%.

Кадыров Зиёратшо Абдуллоевич: концепция и дизайн исследования, 15%

Дмитрий Игоревич Водолажский: анализ данных, критический обзор, научное редакция, 10%

Хуснутдинова Диляра Рашидовна: работа с биологическим материалом 5%

Маркелова Мария Ивановна: обработка материала, софтверная поддержка 5%

Григорьева Татьяна Владимировна: анализ данных, критический обзор, 5%

Черепнев Георгий Валентинович: обзор публикаций критический обзор, 5 %

Сведения об авторах статьи

Фаниев Михаил Владимирович — канд. мед. наук, доцент кафедры эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики факультета непрерывного медицинского образования медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы; Москва, <https://orcid.org/0000-0002-7323-3126>, faniev.mv@gmail.com

Прокопьев Ярослав Валерьевич — канд. мед. наук, доцент кафедры урологии и нефрологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», <https://orcid.org/0000-0002-4345-127X>, yar80@mail.ru

Фаустова Карина Валерьевна — клинический ординатор кафедры акушерства и гинекологии КГМА — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ.

Зиёратшо Абдуллоевич Кадыров — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой эндоскопической урологии и ультразвуковой диагностики факультета непрерывного медицинского образования медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы; Москва, <https://orcid.org/0000-0002-1108-8138>; zieratsho@yandex.ru.

Водолажский Дмитрий Игоревич — канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ медицинской академии имени С.И. Георгиевского при КФУ имени В.И. Вернадского; <https://orcid.org/0000-0003-1114-8732>; dvodolazhsky@gmail.com

Хуснутдинова Диляра Рашидовна — главный инженер проекта Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18; e-mail: dilyahusn@gmail.com; РИНЦ Author ID: 57188680130; <https://orcid.org/0000-0002-9982-9059>

Маркелова Мария Ивановна — младший научный сотрудник OpenLab «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18; e-mail: mimarkelova@gmail.com; РИНЦ Author ID: 57188689882; <https://orcid.org/0000-0001-7445-2091>

Григорьева Татьяна Владимировна — к.б.н, старший научный сотрудник OpenLab «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18; e-mail: tatabio@inbox.ru; Author ID: 56310630200; <https://orcid.org/0000-0001-5314-7012>

Черепнев Георгий Валентинович — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики КГМА — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ <https://orcid.org/0000-0001-7924-8356> rkb2_rt@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.