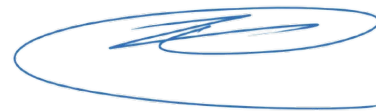


На правах рукописи



Галимов Камиль Шамилевич

**Митохондриальная дисфункция сперматозоидов
в патогенезе мужского бесплодия: молекулярные
и генетические аспекты**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Научный руководитель:

Член-корр. РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Литвицкий Пётр Францевич

Официальные оппоненты:

Шолохов Леонид Федорович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», лаборатория физиологии и патологии эндокринной системы, заведующий лабораторией

Потемина Татьяна Евгеньевна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Защита диссертации состоится « 21 » мая 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8. строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор


Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Мужское бесплодие является глобальной проблемой современного здравоохранения [Agarwal A. et al., 2021; Minhas S. et al., 2021]. В различных странах мира оно выявляется в среднем у 15 % мужчин репродуктивного возраста. В период с 1990 по 2017 гг. стандартизированная по возрасту распространенность этой формы патологии ежегодно увеличивалась на 0,29% [Sun H. et al., 2019]. В настоящее время у каждого двадцатого молодого мужчины количество сперматозоидов недостаточно для нормального выполнения функции воспроизводства [Barratt C. et al., 2018]. В России число мужчин с бесплодием за последние два десятилетия увеличилось более чем в 2 раза [Лебедев Г.С. и др., 2019].

Конкретные причины и механизмы ухудшения репродуктивного здоровья мужчин исследованы недостаточно, несмотря на интенсивную разработку этой проблемы [Божедомов В. и др., 2020; Burke N. et al., 2022; Grau M. et al., 2022]. Количество статей, индексируемых в PubMed по этой тематике, превысило 56 тыс., в том числе более 20 тыс. за последнее десятилетие. Активно изучаются аспекты диагностики и лечения мужского бесплодия на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях [Корнеев И.А., 2019; Wu X. et al., 2022; Chen G. et al., 2023; Pereira R., 2023]. Сдвиг парадигмы к протеомным, транскриптомным и т.п. исследованиям выявил несколько кандидатов на роль биомаркеров, которые ассоциированы с многочисленными причинами бесплодия. В то же время, не достигнуто значительного прогресса в ответах на фундаментальные вопросы андрологии. Кроме того, еще недостаточно надежных методов диагностики и эффективных стратегий ведения пациентов после интрацитоплазматического введения в яйцеклетку сперматозоида и других процедур ЭКО.

Одним из нерешенных является вопрос о роли митохондрий сперматозоидов в генезе репродуктивных нарушений. В фокусе научных поисков причин и механизмов дисфункции митохондрий сперматозоидов, в том числе при мужском бесплодии, находятся три основных направления: расстройства энергетического обеспечения гамет, интенсификация в них окислительного стресса и процесса апоптоза [Park Y., Pang M., 2021].

Митохондрии занимают центральное место в метаболизме сперматозоидов. Это обусловлено участием митохондрий в синтезе макроэргических фосфатов и поддержании окислительно-восстановительного потенциала (ОВП); регуляции пролиферации и дифференцировки сперматозоидов; их апоптоза и митофагии; генерации активных форм кислорода; реализации внутриклеточного сигналинга и других процессов, обеспечивающих

подвижность жгутиков, капациацию, акросомальную реакцию, активацию ооцитов и слияние гамет [Vertika S. et al., 2020]. В большинстве случаев изменения этих процессов в сперматозоидах ассоциированы с субфертильностью и/или бесплодием мужчин. Продемонстрирована тесная связь между изменениями в митохондриальном геноме, протеоме, метаболоме и оплодотворяющей способностью сперматозоидов. Выявлены ключевые белки митохондрий (АТФ-синтаза, сиртуины и др.), участвующие в репродуктивном процессе. Показана корреляция аберрантной экспрессии генов этих белков с ухудшением качественных и количественных характеристик эякулята [Joseph S., Mahale S., 2021].

Интегральным показателем метаболического и энергетического статуса клеток, в том числе сперматозоидов, считается соотношение $[NAD^+]/[NADH]$ [Xiao et al., 2018]. Редокс-состояние пиридиннуклеотидов – важнейший показатель гомеостаза и индикатор интенсивности метаболизма, а также регулятор передачи внутриклеточных сигналов в ответ на стимулы, включая стрессорные. NAD^+ используется в качестве субстрата поли(АДФ-рибоза)-полимеразами и сиртуинами, чьи мишени и конечные продукты регулируют рост и продолжительность жизни сперматозоидов. При низком уровне NAD^+ в них тормозится ацетилирование гистонов, их замещение протаминами в ходе спермиогенеза, растет доля аномальных сперматозоидов [Li F. et al., 2023].

Степень разработанности темы исследования

Роль митохондрий в энергетическом обеспечении сперматозоидов является предметом дискуссий [Castellini C. et al., 2021]. В серии «омиксных» исследований получены доказательства ведущей роли в развитии мужского бесплодия аберрантной экспрессии белков митохондрий, причастных, прежде всего, к энергопродукции, регуляции апоптоза и митофагии [Liang J. et al., 2021; Omolaoye T., 2022 и др.].

Характерной чертой митохондриального генома является большая скорость накопления мутаций и высокий полиморфизм. Эти особенности объясняются отсутствием в органелле гистонов и механизмов репарации ДНК, что увеличивает частоту ошибок ее репликации, а также, учитывая близость мтДНК к дыхательным комплексам, патогенным воздействием АФК [Das A. et al., 2022]. Многие митохондриальные однонуклеотидные полиморфизмы (mtSNP) закрепились в различных популяциях в ходе эволюции человека. Из-за исключительно материнского наследования мтДНК и того факта, что геном митохондрий не рекомбинирует, их SNP накапливаются и передаются потомкам по материнской линии [Di Emidio G. et al., 2021].

Мутации мтДНК тесно связаны с нарушением энергообеспечения сперматозоидов, что может приводить к астенозооспермии, олигозооспермии и тератозооспермии. Опубликовано большое количество работ, посвященных роли мтДНК в развитии мужского бесплодия, однако данные о роли мутаций в гене митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*) и гена белка репарации ДНК *XRCC1* единичны [Karimian M., 2020; Jaweesh M. et al., 2022]. Мутации митохондриальных генов сопровождаются различными нарушениями, особенно в комплексе III, что может прерывать процесс продукции АТФ. Вместе с тем, отсутствуют аналитические исследования связи генетического и биохимического статуса сперматозоидов в норме и при мужском бесплодии, а также их влияния на исходы процедур ВРТ.

Цель исследования

Изучить роль митохондриальной дисфункции сперматозоидов в развитии мужского бесплодия по результатам оценки их энергетического и молекулярно-генетического статуса.

Задачи исследования

1. Исследовать изменения показателей состояния митохондрий сперматозоидов при мужском бесплодии: процессов их энергетического обеспечения; окислительно-восстановительного потенциала системы пиридиннуклеотидов; уровней цАМФ, АТФ, кальция; основных энергетических субстратов и активности ферментов их превращений.
2. Оценить возможность и перспективы использования данных о содержании кофермента НАД⁺ и редокс-потенциале эякулята в качестве биомаркера диагностики и предиктора мужского бесплодия.
3. Изучить полиморфизм генов митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*) и репарации ДНК *XRCC1*, а также их сопряженность с метаболическими расстройствами у пациентов с различными типами нарушения спермограммы.
4. Выявить наличие и степень ассоциации между выраженностью фрагментации ДНК сперматозоидов и уровнем их редокс-потенциала как меры окислительного стресса в норме и при идиопатическом мужском бесплодии.
5. Исследовать в эксперименте на модельных системах *in vitro* эффективность карнитинсодержащих препаратов с антиоксидантной активностью для лечения мужского бесплодия; сформулировать критерии их рационального назначения.

Научная новизна

В работе впервые получены фактические данные о митохондриальной дисфункции сперматозоидов у бесплодных мужчин, которая характеризуется нарушением процессов энергообеспечения гамет, ассоциированным с изменениями генотипа митохондрий. Об этом свидетельствуют: падение внутриклеточных уровней АТФ, а также вторичных мессенджеров цАМФ и ионов кальция; дисбаланс в гаметах ключевых субстратов окисления; нарушение соотношения в них окисленных и восстановленных форм никотинамидных нуклеотидов (NAD^+ и NADH); снижение их редокс-потенциала; сочетание генотипов rs527236194*CC гена митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*), аллеля rs25487*G и генотипа rs25487*GG гена белка *XRCC1* с повышенным риском развития астенотератозооспермии.

Доказано, что развитие митохондриальной дисфункции сперматозоидов у мужчин с астенотератозооспермией ассоциировано с генотипом rs527236194*CC полиморфного локуса rs527236194 гена цитохрома В (*MT-CYB*), аллеля rs25487*G и генотипа rs25487*GG гена белка репарации ДНК *XRCC1*. Наличие такой корреляции является предиктором повышенного риска развития мужского бесплодия.

Впервые получены данные об ассоциации степени фрагментации ДНК сперматозоидов и снижения показателя ОВП эякулята у мужчин с идиопатическим бесплодием. Этот факт является основанием для рекомендации по его использованию для оценки интенсивности оксидативного стресса как ключевого патогенетического звена развития бесплодия у мужчин с нормальными параметрами эякулята. Оценка ОВП эякулята, с учетом молекулярно-генетического профиля сперматозоидов, позволяет прогнозировать эффективность антиоксидантной терапии при мужском бесплодии.

Выявление наличия и степени антиоксидантной активности у карнитинсодержащих веществ, предлагаемых для лечения мужского бесплодия на модельных системах *in vitro*, является объективным основанием для рекомендации применения указанных веществ при этой форме патологии.

Установлено, что оптимальное содержание кофермента НАД⁺ в эякуляте фертильных мужчин составляет 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов. Впервые показано, что изменение концентрации НАД в ту или иную сторону является чувствительным маркером развития идиопатического мужского бесплодия, а также может быть одним из критериев оценки успеха/неуспеха ЭКО.

По результатам настоящего исследования разработан новый способ диагностики фертильности эякулята при идиопатическом бесплодии (патент на изобретение № 2789239 от 31.01.2023 г.), основанный на определении содержания NAD^+ и анализе редокс-потенциала гамет.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные углубляют и расширяют теоретические представления о фундаментальных молекулярно-генетических механизмах развития мужского бесплодия, в том числе его идиопатической формы. Результаты исследования дополняют имеющиеся сведения о роли и месте митохондриальной дисфункции в этиологии и патогенезе тяжелых форм мужского бесплодия.

Установленный в настоящей работе факт ассоциации полиморфных вариантов генов цитохрома В и белка репарации ДНК *XRCC1* с нарушениями сперматогенеза может послужить основанием для формирования панели биомаркеров по выявлению сниженной мужской фертильности специалистами учреждений практического здравоохранения.

Предложена количественная оценка пределов колебаний редокс-потенциала сперматозоидов. Выявлены преимущества колориметрического метода его оценки, что позволяет рекомендовать использование этого метода при обследовании мужчин с различными формами патологии репродуктивной функции. На основе полученных данных предложены релевантные молекулярные предикторы для персонализированного подхода к пациентам при проведении диагностических мероприятий и формировании индивидуализированной стратегии лечения.

Материалы диссертации рекомендуются для использования в практике научных исследований этиологии и патогенеза мужского бесплодия, при разработке и апробации методов его диагностики и терапии, а также при подготовке специалистов в образовательных учреждениях системы здравоохранения.

Методология и методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами, был разработан поэтапный план выполнения диссертационной работы, определены объекты, материал и современные методы исследования.

Объектом изучения были бесплодные мужчины ($n=170$), состоящие в браке со здоровыми женщинами от 1 года до 8 лет. В группу сравнения вошли фертильные

доноры спермы, имеющие здоровых детей (n=60).

Материалом исследования и анализа явились эякулят, показатели спермограммы, метаболических и молекулярно-генетических процессов в митохондриях сперматозоидов, а также окислительно-восстановительного статуса эякулята.

В работе использованы современные методы исследования: световая микроскопия эякулята согласно протоколу ВОЗ (2021); лабораторные методы с применением биохимического анализатора и стандартных наборов реагентов, а также молекулярно-генетические методы – метод аллельной дискриминации TaqMan и секвенирование генов по Сэнгеру на автоматическом ДНК-анализаторе.

Полученные данные систематизированы и проанализированы путем статистической обработки с учетом принципов доказательной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мужское бесплодие в существенной мере является результатом митохондриальной дисфункции сперматозоидов. В её основе: нарушение энергетического обеспечения метаболических процессов, характеризующееся снижением редокс-потенциала сперматозоидов, уровней АТФ, цАМФ и ионов кальция; дисбаланс основных субстратов окисления; недостаточная активность ключевых ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот; изменения в геноме, заключающиеся в ассоциации генотипа rs527236194*CC митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*), аллеля rs25487*G и генотипа rs25487*GG белка *XRCC1* с астенотератозооспермией.

2. Доказана прямая зависимость между изменением величины показателя редокс-потенциала сперматозоидов и степенью фрагментации ДНК, являющегося одним из следствий чрезмерной генерации активных форм кислорода. Данный показатель может применяться для объективной оценки интенсивности оксидативного стресса, как ключевого патогенетического звена бесплодия у мужчин с нормальными значениями эякулята (нормозооспермией).

3. Повышенное содержание кофермента НАД⁺ (более 120 нмоль/10⁶ сперматозоидов), равно как и пониженное (менее 91 нмоль/10⁶ сперматозоидов) является важным маркером идиопатического мужского бесплодия, а также может быть критерием оценки позитивного/негативного исхода ЭКО.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема работы, использованные методы и материалы, полученные результаты и обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология, а именно его пунктам 2, 4, 6 и 11 (отрасль науки: медицинские).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность данных работы обеспечена достаточным объемом исследований, проведенных с использованием современных клинических, биохимических и молекулярно-генетических методов; подтверждена актами внедрения результатов работы в образовательный процесс и комиссионной проверкой первичной документации; надлежащей статистической обработкой данных и публикацией материалов диссертации в ведущих отечественных и зарубежных журналах.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XXII и XXV Международных конференциях молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019, 2022); Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2022); XXI научной конференции с международным участием «Молодые ученые - медицине» (Владикавказ, 2022); XI научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку» (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная наука, актуальные вопросы, достижения и инновации» (Уфа, 2022); XXXII Международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра (Казань, 2022); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции «Фундаментальные исследования в медицине: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Уфа, 2023).

Апробация диссертации проведена на совместной научно-методической конференции сотрудников кафедры патологии человека, кафедры патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 2 от 18 сентября 2023 г.).

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах патофизиологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

(Сеченовский Университет), патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них в изданиях из Перечня Сеченовского Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки РФ и в журналах, включенных в международные базы Web of Science/Scopus/Chemical Abstracts – 6 статей. Получено два патента Российской Федерации: «Способ диагностики фертильности эякулята при идиопатическом бесплодии» (№ 2789239) и «Способ прогнозирования идиопатического мужского бесплодия на основе анализа нуклеотидных вариантов в гене митохондриального цитохрома В» (№ 2800406).

Личный вклад автора

Вкладом автора является разработка плана, цели и задач исследования, анализ отечественных и зарубежных источников литературы; проведение основного объема экспериментальных, лабораторных и клинических исследований; самостоятельная обработка и анализ результатов полученных данных; подготовка, редактирование и оформление публикаций по теме диссертации.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 133 страницах, содержит 16 таблиц, 9 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы (213 источников, из них 31 отечественный и 182 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе кафедры патофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) и в Институте биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Обследовано 230 мужчин, из них состоящих в бесплодном браке – 170 человек. Группу сравнения составили 60 мужчин, имевших от одного до трёх здоровых детей, с доказанной фертильностью, из числа доноров спермы. Средний возраст обследованных пациентов составил $27,6 \pm 0,4$ года.

В рамках исследования все участники подписывали добровольное информированное согласие в соответствии с требованиями Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Работа с донорами спермы велась согласно требованиям приказа № 67 Минздрава Российской Федерации (2003). Контрольная группа была сопоставима по характеристикам выборке инфертильных мужчин.

В соответствии с критериями включения/исключения (Клинические рекомендации «Мужское бесплодие», 2021, утверждены Минздравом РФ) была сформирована группа наблюдения из 170 соматически здоровых мужчин с диагнозом бесплодие (основная группа), однородная по материально-бытовым условиям, обеспеченности медицинской помощью, продолжительности проживания в данном регионе, а также социальному положению.

У всех пациентов проведено комплексное клинико-лабораторное обследование с анализом эякулята. Анализ спермограммы выполнен в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (2021). Данный протокол включает определение таких параметров, как объем и pH спермы, количество, подвижность и морфология сперматозоидов. Спермиологические исследования выполнены в условиях одной лаборатории по стандартизованному протоколу.

О метаболическом статусе семенной плазмы и сперматозоидов судили по ОВП пиридиновых нуклеотидов, т.е. по соотношению $[NAD^+]/[NADH]$, которое рассчитывали исходя из молярных концентраций лактата и пирувата. Содержание лактата в семенной плазме определяли с помощью спектрофотометрического метода (CitricScreen, BioScreen). Уровень пирувата оценивали в сопряженной реакции с использованием фермента ЛДГ (Sigma-Aldrich).

Для определения уровня микроэлементов исследуемые образцы подвергали минерализации с помощью микроволновой системы Anton Pear Multiwave 3000. Концентрацию кальция измеряли с использованием оптической эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (PerkinElmer Optima 2000 DV).

Уровень цАМФ измеряли с использованием набора AMP-ELISA (Enzo Life Sciences/Biomol, Farmingdale). Содержание АТФ в семенной жидкости определяли с использованием системы люциферин/люцифераза (ENLITEN Luciferase/Luciferin Promega Corp). Активность ферментов и содержание субстратов энергетического обмена

оценивали с помощью стандартных наборов отечественных производителей колориметрическими методами на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+.

Для оценки состояния про- и антиоксидантных систем эякулята определяли уровень гидропероксидов липидов, карбонилированных белков и ТБК-реагирующих продуктов с использованием стандартных методик. Общую активность антиокислительных систем в спермоплазме определяли колориметрическим методом с помощью тест-набора “Total antioxidant status” (Randox Laboratories).

Интенсивность свободнорадикальных процессов в эякуляте, а также антиокислительную активность биологически активных добавок в модельных системах, оценивали методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ) с использованием хемилюминометра LKB-Wallac 1256 (Wallac Oy/PerkinElmer®, Финляндия).

Для выделения тотальной ДНК и анализа ее полиморфных локусов был использован нативный эякулят. Тотальную геномную ДНК, содержащую митохондриальную ДНК, выделяли с помощью набора реагентов для определения малых количеств ДНК QIAamp DNA Micro Kit. Определение генотипов полиморфных локусов в гене митохондриального цитохрома В, а также в гене белка репарации ДНК *XRCC1* осуществлялось с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan с использованием прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System. Результаты каждой аллельной дискриминации были проанализированы с использованием программного обеспечения CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad).

Выделенную ДНК использовали для анализа ассоциации генотипов и аллелей полиморфных локусов rs28357373 (T15629C (Leu295=)); rs527236194 (T15784C (p.Pro346=)); rs2853506 (A15218G (p.Thr158Ala)) гена митохондриального цитохрома В *MTCYB*, а также полиморфных локусов rs25487 (Leu295=) и rs415407 (p.Pro346=) гена белка *XRCC1* с риском развития мужского бесплодия.

Для подтверждения наличия изменений нуклеотидной последовательности в гене цитохрома В проводили секвенирование фрагмента данного гена по Сэнгеру на автоматическом ДНК-анализаторе (Life Technologies). Реакцию секвенирования проводили с набором флюоресцентно-меченых ddNTP (Big Dye Terminators v.3.1 RR kit). После этого сравнивали последовательности ДНК обследованных индивидов с референсной последовательностью гена *MT-CYB*.

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 9.0 (Stat Soft, Inc. Критерий Стьюдента t применялся для сравнения показателей между двумя группами. Статистическая значимость была установлена на уровне $p \leq 0,05$. Взаимосвязь между тремя группами оценивалась с помощью анализа ANOVA и Tukey post hoc.

При попарном сравнении частот мутаций в группах больных и здоровых лиц использовался критерий χ^2 (Р) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов odds ratio (OR). В случае наличия достоверных различий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI95%).

Результаты исследования

На основании анализа спермограмм выделено три группы мужчин. Группа I состояла из 60 фертильных доноров. Бесплодные мужчины были разделены на две группы (II и III). Во II группу вошли 65 пациентов без изменений параметров спермограммы (нормоспермия). В III группу вошли 105 мужчин с патоспермией. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Показатели состояния спермы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (средние \pm SD)

Показатель	Фертильные доноры (n=60) Группа I	Бесплодные мужчины		р-значение ANOVA	Апостериорный анализ Туки		
		Нормоспермия (n=65) Группа II	Патоспермия (n=105) Группа III		Группа I в сравнении с группой II	Группа I в сравнении с группой III	Группа II в сравнении с группой III
Объем (мл)	3,6 \pm 0,2	3,4 \pm 0,2	3,5 \pm 0,5	<0.001*	<0.001*	0.044*	0.020*
Количество сперматозоидов ($\times 10^6$ мл)	69,6 \pm 3,9	59,2 \pm 5,1	37,4 \pm 2,0 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
Морфологически нормальные сперматозоиды (%)	8,2 \pm 0,11	8,1 \pm 0,17	3,1 \pm 0,12 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
Прогрессивная подвижность (%)	39,3 \pm 2,5	37,2 \pm 3,2	16,8 \pm 1,9 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
Индекс тератозооспермии	1,45 \pm 0,03	1,7 \pm 0,03 ^{**}	1,75 \pm 0,04 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		

Примечание: * - статистически значимые результаты при $p < 0,05$; ** - $p < 0,05$ по сравнению с фертильными донорами; # - по сравнению с нормоспермией

У пациентов второй группы не обнаружено изменений в спермограмме, у пациентов третьей группы (патоспермия) установлено статистически значимое снижение количества сперматозоидов, повышение их содержания с морфологическими аномалиями и уменьшение доли прогрессивно подвижных сперматозоидов.

Исследование состояния энергетического обмена у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием выявило ряд особенностей содержания и распределения метаболитов в семенной плазме (табл. 2). Прежде всего, это наличие значительного градиента уровня большинства соединений у доноров спермы и бесплодных мужчин с нормо- и патоспермией. Патоспермия характеризовалась значимым уменьшением содержания ионов кальция в семенной плазме ($p < 0,01$), которое совпадало с динамикой изменений цАМФ и превосходило их по амплитуде колебаний. Уровень цАМФ у мужчин с идиопатическим бесплодием при патоспермии также значительно снижался ($p < 0,05$).

Таблица 2 - Содержание метаболитов и редокс-состояние пиридиновых нуклеотидов в семенной плазме здоровых мужчин и у пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (средние \pm SD)

Показатель	Фертильные доноры (n=60) Группа I	Бесплодные мужчины		p (ANOVA)	Апостериорный анализ Туки		
		Нормоспермия (n=65) Группа II	Патоспермия (n=105) Группа III		Группа I против группы II	Группа I против группы III	Группа II против группы III
Кальций, мМ/л	5,15 \pm 0,42	4,36 \pm 0,29	2,28 \pm 0,25 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
цАМФ, пМ/мл	27,9 \pm 2,2	24,6 \pm 2,2	14,6 \pm 1,5 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
Лактат, мМ/л	4,51 \pm 0,32	6,38 \pm 0,43	9,04 \pm 0,67 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
АТФ, нМ/мл	53,0 \pm 6,5	54,1 \pm 6,0	35,0 \pm 4,2 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
Пируват, мМ/л	2,14 \pm 0,11	2,02 \pm 0,12	1,26 \pm 0,09 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		
[НАД ⁺]/[НАДН]	4317 \pm 38	2922 \pm 25 [#]	1394 \pm 15 ^{#, **}	<0.001*	<0.001*		

Примечание: * - статистически значимые результаты при $p < 0,05$; ** - $p < 0,05$ по сравнению с фертильными донорами; # - по сравнению с нормоспермией

Концентрация АТФ в спермоплазме у бесплодных мужчин с отклонениями в спермограмме была снижена и составляла 66% от контрольной величины. Учитывая существенную роль аденозинтрифосфата в обмене веществ, этот факт является основанием говорить о прямой или опосредованной связи значительной части метаболических сдвигов при патоспермии с дефицитом макроэргов.

У бесплодных пациентов с нормоспермией и патоспермией наблюдалось статистически значимое снижение соотношения [NAD⁺/NADH] – до 67% и 32% уровня

фертильных доноров, соответственно. Патоспермия характеризовалась отрицательной зависимостью между величиной редокс-потенциала, с одной стороны, и прогрессивной подвижностью сперматозоидов и долей аномальных сперматозоидов, с другой.

Указанные данные соответствуют представлениям о роли редокс-статуса никотинамидных коферментов в контроле активности митохондрий, состояния их ионных каналов и степени эпигенетических модификаций хроматина. Это, в свою очередь, детерминирует вероятность инициации апоптоза сперматозоидов, скорость пролиферации и дифференцировки сперматогоний и другие жизненно важные явления в репродуктивных органах [Sengupta P. et al., 2022]. Результаты проведенных исследований послужили предпосылкой для разработки способа диагностики фертильности при идиопатическом бесплодии (патент на изобретение № 2789239), который основан на количественном определении кофермента NAD^+ в эякуляте. Для измерения концентрации NAD^+ использован колориметрический метод в соответствии с инструкцией производителя (Kit Booklet NAD/NADH Cell-Based Assay Kit, Cayman Chemical). При значении концентрации NAD^+ в интервале, равном 91-120 нмоль/ 10^6 сперматозоидов, эякулят оценивали как фертильный.

Предложенный способ был применен у 30 фертильных и 65 бесплодных мужчин. Анализ результатов показал статистически достоверные изменения в показателях эякулята и концентрации NAD^+ у обследованных пациентов с учетом их возрастной категории (табл. 3).

Таблица 3 – Показатели эякулята и уровень NAD^+ здоровых мужчин и пациентов с бесплодием в зависимости от их возраста ($M \pm m$)

Показатель	Группа обследованных			
	Фертильные (n=60)	Бесплодные (n=170)		
		>30 лет	30-40 лет	>40 лет
Концентрация NAD^+ нмоль/ 10^6 сперматозоидов	91,25±13,23	91,61±15,53	115,25±16,55*	125,60±16,29*
Объем эякулята, мл	3,6±0,2	3,5±0,2	2,9±0,32*	2,8±0,42*
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	71,2±5,4	41,8 ± 5,3*	30,6 ± 2,4*	22,9 ± 2,3*
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	44,7±2,4	37,9±2,8*	30,9±1,8*	24,6±1,8*
Морфологически нормальные формы, %	60,3±5,9	30,3±3,9*	25,3±2,6*	20,9±5,8*

*различия с фертильными мужчинами статистически значимы при $p < 0,05$

Из таблицы видно, что выход показателей НАД⁺ за пределы диапазона референтных значений свидетельствует о наличии у мужчины инфертильности.

Клинический пример

Пациент Г., 34 лет; супруга М., 30 лет; состоят в бесплодном браке в течение 6 лет. В анамнезе 3 неудачные попытки ЭКО-ИКСИ. При обследовании женщины патологии со стороны репродуктивной системы не выявлено. При изучении эякулята супруга содержание НАД⁺ составило 164 нмоль/10⁶ сперматозоидов. Эякулят оценен как инфертильный. При лабораторном исследовании эякулята не выявлено существенных отклонений его характеристик от нормы: уровень подвижности сперматозоидов составил 48% (категория А - 30%, категория В - 18%); показатель сперматозоидов с нормальной морфологией составил 22%, концентрация - 44 млн/мл. Заключение. Уровень НАД⁺ в эякуляте у пациента Г. свидетельствует о его инфертильности. Анализ показателей спермограммы не выявил возможных причин снижения оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Приведенный пример демонстрируют, что предлагаемый метод определения НАД⁺ в гаметях позволяет выявить нарушения репродуктивной функции мужчин до исследования спермограммы. Преимуществами метода является возможность использования его результатов в качестве надежного биомаркера идиопатического мужского бесплодия, предиктора исходов процедуры ЭКО/ИКСИ, а также для первичного скрининга образцов эякулята фертильных доноров спермы.

Об изменении процессов энергопродукции в митохондриях при бесплодии судили также по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и изоцитратдегидрогеназы (ИДГ), ключевых флавиновых и пиридиновых оксидоредуктаз цикла трикарбоновых кислот, катализирующих окисление ФАД- и НАД-зависимых субстратов (табл. 4).

Таблица 4 - Активность митохондриальных ферментов СДГ и ИДГ в сперматозоидах здоровых мужчин и у пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

Показатель	Фертильные доноры (n=60)	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия (n=65)	Патоспермия (n=105)
СДГ, нМ/мин/мг белка	122±4,7	106±19,8*	90±12,5**
ИДГ, нМ/мин/мг белка	185±28,3	156±13,1*	79±10,8**

Примечание: *Различия статистически значимы по сравнению с фертильными донорами при $p < 0,01$; **Различия статистически значимы между группами бесплодных мужчин при $p < 0,01$

Установлено более выраженное снижение активности в гаметах ИДГ при патоспермии – до 42% контрольных величин. Это не противоречит данным о том, что блокада цикла трикарбоновых кислот в сперматозоидах на уровне изоцитрата сопровождается энергетическим дефицитом, нарушением биогенеза акросомы и жгутика с остановкой спермиогенеза [Zhu S. et al., 2022].

При оценке содержания энергетических субстратов у пациентов с бесплодием установлено, что наибольшие изменения претерпевал уровень глюкозы, который значимо снижался на 48% и 82% у пациентов с пато- и нормоспермией, соответственно. Это свидетельствует об интенсификации гликолиза в условиях убыли АТФ и снижения энергетической значимости пирувата, т.е. играет компенсаторную роль.

Метаболизм глюкозы контролируется преимущественно двумя основными ферментами: гексокиназой (ГК) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ), которые катализируют реакции окисления глюкозы в клетках по двум путям: гликолизу и пентозофосфатному циклу. Результаты оценки их активности представлены в табл. 5.

Таблица 5 - Активность гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эякуляте здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

	Фертильные доноры (n=60)	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия (n=65)	Патоспермия (n=105)
Гексокиназа (пМ/мг белка в мин)	11,9±1,2	18,5±0,9*	16,5±1,4*
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (пМ/мг белка/мин)	2,83±0,41	2,71±0,52	2,56±0,63

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,01$

Полученные данные свидетельствуют об интенсификации окисления глюкозы. У бесплодных пациентов активность ГК статистически значимо увеличивалась на 39-65%, что сочеталось со снижением концентрации глюкозы вследствие ускорения её утилизации. Скорость Г6ФДГ-реакции значимо не изменялась, что может означать ограничение использования апотомического пути для регенерации НАДФН+Н⁺, источника восстановительных эквивалентов для глутатиона и стабилизации каталазы.

Приведенные результаты и их трактовка согласуются с мнением других авторов о возможных механизмах изменения энергопродукции в мужских гаметах при инфертильности и могут свидетельствовать о высокой чувствительности и уязвимости процессов окислительного фосфорилирования в органах мужской детородной системы [Botezatu A. et al., 2022].

Изменения нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) сперматозоидов являются одной из основных причин мужского бесплодия, приводящие к нарушению их энергообеспечения и подвижности. Нами проведен анализ трех полиморфных вариантов гена митохондриального цитохрома В у пациентов с бесплодием и у здоровых мужчин с нормальными показателями спермы (табл. 6).

Таблица 6 - Частота распределения различных вариантов мтДНК у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

SNP	Изменения последовательности мтДНК (изменения структуры белка)	Генотипы полиморфных локусов	Пациенты с нормоспермией, N (%)	Пациенты с патоспермией N (%)	Группа фертильных мужчин	P-value (OR, 95%CI)
rs28357373	T15629C (Leu295=)	CC CT TT	0 (0%) 0 (0%) 65 (100%)	0 (0%) 0 (0%) 89 (100%)	0 (0%) 0 (0%) 164 (100%)	p>0,05
rs527236194	T15784C (p.Pro346=)	CC CT TT	6 (9,23%) 0 (0%) 59 (90,7%)	12 (13,5%) 0 (0%) 77 (86,5%)	10 (6,1%) 0 (0%) 154 (93,9)	p=0,04* (OR=2,4; 95%CI=0,99-5,8)
rs2853506	A15218G (p.Thr158Ala)	GG AG AA	2 (3,0%) 0 63 (97%)	3 (3,3%) 0(0%) 86 (96,7%)	4(2,6%) 0(0%) 160 (97,6%)	p>0,05

Анализ распределения частот генотипов полиморфного локуса rs527236194 гена митохондриального цитохрома В выявил статистически значимую разницу между бесплодными пациентами с патоспермией и группой фертильных индивидов (p=0,04). Полиморфизм rs527236194 гена цитохрома В обуславливает замену триплета [CCT] на [CCC] в позиции 15784 и приводит к синонимичной замене пролина в позиции 346 белка. Несмотря на то, что этот полиморфизм не модифицирует структуру белка, он может играть регуляторную роль и, по мнению Jaweesh M. et al. (2022), смещение кодонов может быть механизмом, контролирующим уровень экспрессии генов.

Проблемы сперматогенеза, развития яичек и миграции сперматозоидов могут быть связаны с нарушениями репарации ДНК. Одним из центральных факторов репарации ДНК является белок XRCC1. Результаты генотипирования полиморфных вариантов rs25487 и rs415407 гена *XRCC1* у пациентов с нормо- и патоспермией и в группе фертильных мужчин, а также анализ ассоциации данных полиморфных локусов гена *XRCC1* с риском развития мужского бесплодия представлены в табл. 7.

Таблица 7 - Распределение частот генотипов полиморфных локусов rs25487 и rs415407 гена *XRCC1* у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

SNP	Изменения последовательности ДНК (изменения в структуре белка)	Генотипы полиморфных локусов	Пациенты с нормоспермией, N=80 (%)	Пациенты с патоспермией N=42 (%)	Группа фертильных мужчин N=91	χ^2 P-value (OR, 95% CI)
rs25487	c.1196A>G Arg399Gln)	AA AG GG	27 (33%) 42 (52,5%) 11 (13,75%)	6 (17,6%) 23 (54,8%) 13 (28,7%)	31 (34%) 49 (53,8%) 11 (12%)	Для AA: P=0,03 OR=0,33 95% CI=0,12-0,87 Для GG: P=0,03 OR=2,8 95% CI=1,13-7,00
rs415407	g.56119129A>C интронный вариант)	AA AC CC	22 (27,3%) 40 (49,8%) 18 (22,2%)	11 (26,2%) 22 (52,4%) 9 (21,4%)	25 (27,5%) 43 (47,3%) 23 (25,2%)	P>0,05

Результаты свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса rs25487 в гене *XRCC1* с риском развития идиопатического мужского бесплодия. Так, генотип rs25487*GG статистически значимо чаще встречался у пациентов с патоспермией (28,7%) по сравнению с индивидами с нормоспермией (13,75%) и фертильной группой (12%). Напротив, генотип rs25487*AA и аллель rs25487*A гена *XRCC1* обладают протективным эффектом относительно риска развития патологии спермограммы.

Динамика показателей **окислительного стресса** при бесплодии имела свои особенности. Для оценки генерации АФК использовали способ измерения сверхслабого свечения, возникающего при добавлении люминола для усиления хемилюминесценции (ХЛ). При расшифровке параметров ХЛ у пациентов с бесплодием было зафиксировано увеличение светосуммы, что соответствует результатам определения других параметров окислительного статуса эякулята в тех же образцах (табл. 8).

Таблица 8 - Показатели состояния липопероксидного процесса в эякуляте здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

Показатель	Здоровые мужчины	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия	Патоспермия
LPx, нМ/л	15,1±1,9	24,1±2,3*	28,1±1,9*
Карбонилированные белки, нМ/мг	22,1±2,9	43,4±3,5*	42,8±3,1*
ТБК-РП, нМ/мг белка	0,28±0,02	0,45±0,04*	0,49±0,05*
ОАА, нМ/мл	2,74±0,26	2,11±0,32*	1,21±0,09**

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем при p<0,05

**Различия статистически значимы между группами бесплодных мужчин при p<0,05

О степени активации окислительного стресса судили также по уровню продуктов липопероксидации – гидропероксидов липидов (LPx) и ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-РП). Степень карбонильной модификации биополимеров эякулята оценивали по образованию карбонилированных белков. Оценку антиоксидантного статуса эякулята проводили, определяя его общую антиокислительную активность (ОАА).

У бесплодных пациентов уровень LPx был статистически значимо выше, чем у фертильных доноров. Гидропероксиды липидов превращаются во вторичные дериваты: малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль (4-HNE) и др. 4-HNE в низких концентрациях выступает как сигнальная молекула при экспрессии генов, при избытке – как промотор патогенных процессов [Milkovic L. et al., 2023]. Благодаря высокой реакционной способности, он алкилирует белки, повреждает ДНК клеток и вызывает их гибель. Обнаруженный нами факт увеличения степени карбонилирования белков эякулята при бесплодии является не случайной находкой. Одной из мишеней карбонилирования являются белки капацитации, что влечет значительное снижение способности сперматозоидов к проникновению в яйцеклетки [Lone S. et al., 2019].

К карбонилирующим агентам относятся и т.н. ТБК-реагирующие продукты – соединения, вступающих во взаимодействие с тиобарбитуровой кислотой, основным представителем которой является малоновый диальдегид (МДА). По нашим данным, уровень ТБК-РП в эякуляте пациентов обеих групп с бесплодием существенно превышал показатели фертильных доноров. ТБК-РП способны избирательно связываться с азотистыми основаниями ДНК и поэтому имеют мутагенные, в том числе, канцерогенные свойства [Colzani M. et al., 2018].

Положение о сопряженности повреждения ДНК сперматозоидов с дисбалансом редокс-потенциала нашло подтверждение в нашем исследовании. У бесплодных мужчин доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК при нормоспермии составила 10,9%, а при патоспермии – 12,1%, достигая у отдельных индивидов очень высоких значений – до 82%, превышая показатели фертильных доноров в 2 и более раза. При анализе взаимосвязей индекса фрагментации ДНК гамет бесплодных мужчин и параметров оксидативного статуса обнаружена прямая корреляция степени повреждения генетического материала от уровня карбонильных дериватов и величины редокс-потенциала, и обратная – от общей антиокислительной активности. Ранее эта зависимость была показана при патозооспермии, но не при бесплодии с нормальными

показателями эякулята. На основании этих результатов можно сделать допущение о том, что у бесплодных мужчин с нормальной спермограммой снижение оплодотворяющей способности обусловлено гиперфрагментацией ДНК в условиях нарушения равновесия между продукцией АФК и антиоксидантной защитой, а также дисбаланса ОВП.

Таким образом, можно констатировать, что центральная роль в регуляции метаболизма в гаметях и репродуктивных органах в норме и при различных формах патологии принадлежит митохондриям. Это предопределяет необходимость разработки новых методов терапии мужского бесплодия, основанных на восстановлении их функций, включая целевую коррекцию метаболизма НАД⁺ и системы никотинамидных коферментов в целом, а также стратегии рационального назначения антиоксидантов.

Первое направление является относительно новым и считается перспективным. Так, продемонстрировано защитное действие стимулятора метаболизма НАД – никотинамидмононуклеотида, на сперматогенную функцию у мышей с сахарным диабетом [Ma D. et al., 2022]. Что касается второго направления, то эффективность лечения бесплодия антиоксидантами остаётся низкой, особенно в части повышения показателей живорождения и частоты беременности [Steiner A. et al., 2020]. Это может быть обусловлено как эмпирическим характером терапии с развитием дисбаланса редокс-систем эякулята, так и передозировкой антиоксидантов.

Исходя из этого, выполнено сравнение антиоксидантной активности препаратов на основе L-карнитина в эксперименте на двух модельных системах, первая из которых позволяет оценить влияние БАД на железоиндуцированную хемилюминесценцию, вторая – дать характеристику их эффектов в условиях, близких к процессам ПОЛ в биосредах. Протестированы препараты «АндроДоз®» (АО «Нижфарм», Россия) и «Проксид® плюс» (Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc., Италия), широко применяемые в клинической практике для лечения мужского бесплодия [Micic S. et al., 2021].

Внесение препаратов в инкубационную среду в количестве, сопоставимом по содержанию карнитина с его физиологическим уровнем в семенной плазме, угнетало свечение модельной системы. При этом, если «Проксид® плюс» практически полностью ингибировал образование радикалов, то «АндроДоз®» в эквивалентной дозе снижал интенсивность ХЛ лишь на 2/3 от исходной величины. Практически в тех же пропорциях препараты подавляли интенсивность ПОЛ в системе с липопротеиновыми комплексами, сходными с липидами крови, то есть антиоксидантная активность

сохранялась в физиологических условиях.

Таким образом, антиоксидантные свойства препаратов определяются величиной их конечной концентрации в среде инкубации, что в клинических условиях, в зависимости от уровня в эякуляте, может вызывать негативные эффекты. К их числу относится развитие «антиоксидантного парадокса», когда введение больших доз препаратов сопровождается малым или нулевым эффектом, что может быть обусловлено резистентностью эндогенных редокс-систем к высоким дозам антиоксидантов [Henkel R., 2021]. Как свидетельствуют наши данные, необходимо предварительное тестирование активности препаратов *in vitro* для выбора оптимального подхода к их назначению и профилактике осложнений в виде редуцированного стресса.

В целом, основными особенностями дисфункции митохондрий сперматозоидов и сопряженных метаболических процессов при бесплодии являются: уменьшение редокс-потенциала пиридиннуклеотидов эякулята; выраженные сдвиги концентрации вторичных мессенджеров – кальция и цАМФ, а также энергетических субстратов и макроэргов – глюкозы, пирувата, лактата, цитрата и АТФ; гиперстимуляция креатинкиназы и гексокиназы на фоне активации свободнорадикальных процессов и фрагментации ДНК. Обнаружены также ассоциации полиморфных вариантов гена цитохрома В и гена репарации ДНК *XRCC1* с риском снижения фертильности у мужчин с инверсией окислительно-восстановительного статуса эякулята.

Высокая пластичность митохондрий, которые сравнительно легко изменяют свою локализацию и метаболическую активность, затрудняет однозначную интерпретацию имеющегося в настоящее время массива данных об их функциях. Расшифровка молекулярно-генетических механизмов дисфункции митохондрий может стать ключом к разработке новых методов диагностики и таргетной терапии мужского бесплодия.

ВЫВОДЫ

1. Ключевым звеном патогенеза мужского бесплодия является митохондриальная дисфункция сперматозоидов. Она характеризуется нарушением энергетического обеспечения сперматозоидов и проявляется снижением их редокс-потенциала, гипертрофированным состоянием системы пиридиннуклеотидов, дефицитом АТФ, цАМФ и ионов кальция, дисбалансом ключевых субстратов процесса окисления, недостаточной активностью его ферментов, что в совокупности существенно снижает способность гамет к оплодотворению яйцеклетки.

2. Концентрация кофермента НАД⁺ в диапазоне 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов представляет собой важнейший критерий мужской фертильности, а также чувствительный предиктор позитивного/негативного исхода ЭКО.
3. Обнаружена ассоциация полиморфных локусов rs527236194 гена митохондриального цитохрома В, rs25487*GG и аллеля rs25487*G гена белка репарации ДНК XRCC1 с повышенным риском развития мужского бесплодия.
4. Тесная взаимосвязь между степенью изменения редокс-потенциала эякулята и выраженностью фрагментации ДНК сперматозоидов является основанием для использования этого показателя с целью оценки интенсивности оксидативного стресса как ключевого патогенетического звена развития бесплодия у мужчин с нормальными показателями состояния эякулята (нормозооспермией).
5. Тестирование антиоксидантной активности карнитинсодержащих лекарственных препаратов для лечения мужского бесплодия на использованных в работе модельных системах *in vitro* является условием для рекомендации по их применению при этой форме патологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Галимова С.Ш., Хайбуллина З.Г., Аверьянова К.С., **Галимов К.Ш.** / Окислительно-восстановительный потенциал эякулята: значение и принципы коррекции // Уральский научный вестник. - 2018. Т. 10. № 3. С. 046-051.
2. Galimov Sh., Gromenko J., Bulygin K., **Galimov K.** The level of secondary messengers and the redox state of NAD⁺/NADH are associated with sperm quality in infertility. **J. Reprod. Immunol.** – 2021;148:103383. [Web of Science, Scopus]
3. Галимов Ш.Н., Громенко Ю.Ю., Громенко И.Д., **Галимов К.Ш.** Влияние биологически активных добавок на основе L-карнитина на свободнорадикальные процессы в модельных системах // **Вестник урологии.** – 2021. Т.14. №4. С. 21-29. [Scopus]
4. Литвицкий П.Ф., **Галимов К.Ш.**, Громенко Ю.Ю. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** - 2022. Т. 66, № 2. С. 72-79. [Chemical Abstracts]
5. **Галимов К.Ш.**, Бодрова Е.С., Галимова С.Ш., Мочалов К.С. Прогностические маркеры фертильности и свободнорадикальные нарушения при мужском бесплодии

//Теоретические и прикладные аспекты естественнонаучного образования. Мат. Всероссийской научно-практической конференции. 2022. С. 120-124.

6. Галимов Ш.Н., Громенко Ю.Ю., Галимов К.Ш. Молекулярные механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска // **Урология**. – 2022. № 4. С. 114-117. [Scopus]

7. Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., И.Р. Гилязова, П.Ф. Литвицкий. Мутации гена митохондриального цитохрома В (MT-CYB) в сперматозоидах пациентов из бесплодных семейных пар // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2023. Т. 67, № 1. С. 21-27. [Chemical Abstracts]

8. Галимов К.Ш., Гилязова Г.Р., Щербакова Э.Д. Функциональная активность митохондрий при идиопатическом бесплодии у мужчин // **Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: Материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей**. С-Пб, 2022. С. 282.

9. Галимова Э.Ф., Громенко Ю.Ю., Галимов К.Ш. Роль и место никотинамидных коферментов в диагностике бесплодия // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2023. Т. 18, № 1(103). С. 5-8.

10. Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Громенко Р.И., Галимов К.Ш., Литвицкий П.Ф. Фрагментация ДНК сперматозоидов: связь с мужским бесплодием и методы коррекции // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2023. Т. 67, № 3. С. 142-148. [Chemical Abstracts]

11. Компьютерный анализ эякулята CASA: преимущества и перспективы / К.Ш. Галимов, И.Д. Громенко, Д.Д. Громенко, Э.М. Муратов, П.Ф. Литвицкий // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2023. Т. 18, № 1(103). С. 92-95.

ПАТЕНТЫ

1. Галимова Э.Ф., Галимова С.Ш., Мочалов К.С., Галимов Ш.Н., Галимов К.Ш. и др. Способ диагностики фертильности эякулята при идиопатическом бесплодии // **Патент РФ на изобретение № 2789239 от 31.01.2023**.

2. Галимова Э.Ф., Галимова С.Ш., Мочалов К.С., Галимов Ш.Н., Галимов К.Ш. и др. Способ прогнозирования идиопатического мужского бесплодия на основе анализа нуклеотидных вариантов в гене митохондриального цитохрома в // **Патент РФ на изобретение № 2800406 от 21.07.2023**.