

*На правах рукописи*



**Хасанова Елена Минсалимовна**

**Особенности факторов врождённого иммунитета при нарушении репродуктивной  
функции мужчин**

3.2.7. Иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Ганковская Людмила Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

**Балмасова Ирина Петровна** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биологии научно-исследовательского медицинского стоматологического института, ведущий научный сотрудник

**Пичугова Светлана Владимировна** - кандидат медицинских наук, Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Клинико-диагностический центр имени Я.Б. Бейкина», лаборатория электронной микроскопии, заведующая лабораторией

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «18» июня 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО ПГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

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

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

  
**Калюжин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время бесплодие приобрело статус глобальной социально-демографической проблемы, с которой сталкиваются миллионы людей репродуктивного возраста во всем мире при планировании семьи. За последние два десятилетия в России зарегистрирован прирост мужчин с бесплодием в 2,1 раза [Лебедев Г.С., 2019]. Кроме того, наблюдается тенденция к ухудшению качества эякулированных сперматозоидов и росту встречаемости «мужского» фактора нарушения фертильности, который выявляется в 50% случаев при обследовании пар на бесплодие, что является критическим показателем для популяционной репродуктологии [Zhang J., 2020].

В последние годы учеными активно обсуждается роль механизмов врождённого иммунитета (ВИ) в патогенезе нарушения фертильной функции мужчин. Факторы ВИ в мужском репродуктивном тракте обеспечивают множество процессов: распознавание различных патогенных микроорганизмов, развитие и регуляцию воспаления, поддержание иммунопrivилегированного статуса семенников, формирование структуры гликокаликса сперматозоидов и обеспечение их функциональной активности [Wigby S., 2019]. Исследование иммунопатогенетических механизмов снижения мужской фертильной функции представляет собой важный аспект иммунологии репродукции. Кроме того, было продемонстрировано, что ядерные гены сперматозоидов экспрессируются в виде белков митохондриальными рибосомами даже после созревания и эякуляции [Gur Y., 2008]. Такой результат научных исследований открывает новые возможности и перспективы для изучения молекулярно-генетических механизмов нарушения фертильности зрелых сперматозоидов.

Изучение факторов ВИ позволит значительно расширить понимание патогенетических механизмов идиопатического бесплодия (ИДБ), от которого страдает от 31 до 75% мужчин во всем мире [Bracke A., 2018]. На сегодняшний день ещё отсутствует целостное понимание того, как именно ВИ влияет на морфофункциональные особенности сперматозоидов. Проведены единичные исследования роли активации паттерн-распознающих рецепторов сперматозоидов TLR2 и TLR4 (Toll-like receptor, TLR), экспрессии генов в сперматозоидах и содержания в семенной жидкости белков теплового шока HSP60, HSP70, HSP90 (heat shock proteins, HSP), баланса цитокинов в эякуляте и влияния этих и других факторов ВИ на фертильность сперматозоидов, однако эти данные имеют разрозненный и противоречивый характер и требуют уточнения [Politch J.A., 2007; Fujita Y., 2011; Nowicka-Bauer, K., 2022].

В процессе развития в эпидидимисе половые клетки и их гликокаликс подвергаются значительным морфологическим и биохимическим изменениям. Одной из таких модификаций является появление в структуре гликокаликса молекул противомикробных пептидов (ПМП)

семейства  $\beta$ -дефензинов HBD1 и HBD126 (HBD, human  $\beta$ -defensin), которые участвуют в формировании функциональных свойств сперматозоидов и защищают их от патогенов и иммунных факторов в женском репродуктивном тракте [Zupin, L., 2019; Agram R., 2019]. Недостаточность экспрессии  $\beta$ -дефензинов ассоциирована с нарушением подвижности сперматозоидов и, соответственно, невозможностью оплодотворения [Diao R., 2014]. В структуре гена *HBD126* был идентифицирован полиморфизм rs11468374. Предполагается, что носительство данной мутации опосредует нарушение структуры гликокаликса и снижение фертильности сперматозоидов [Tollner T.L., 2011]. Однако на сегодняшний день отсутствует комплексное исследование роли  $\beta$ -дефензинов в патогенезе мужского ИДБ. К тому же, рутинное исследование эякулята в рамках спермограммы позволяет изучить морфофункциональное состояние сперматозоидов, но не учитывает их биохимические особенности, и потому требуется расширение методов диагностики мужской репродуктивной дисфункции, включающее в себя определение мутантной формы гликокаликса.

Несмотря на интенсивное изучение этиологии и механизмов нарушения мужской фертильности и широкое внедрение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), остается актуальным поиск новых способов диагностики причин нарушения фертильности и улучшения показателей репродуктивного здоровья мужчин. Определение роли системы ВИ в патогенезе мужского бесплодия – это несомненно актуальная задача, так как появление новых знаний в этой области позволяет усовершенствовать диагностику и предложить новые подходы к анализу причин нарушения мужской репродуктивной функции.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Работы многих исследователей посвящены изучению роли иммунной системы в патогенезе мужского бесплодия. Долгое время считалось, что вклад иммунной системы в развитие мужского бесплодия обусловлен эффекторными механизмами адаптивного иммунитета – нарушением механизмов периферической иммунологической толерантности и активацией лимфоцитов с последующей выработкой антиспермальных антител [Anderson D.J., 1988]. В настоящее время на основании экспериментальных и клинических исследований показано значимое влияние факторов врождённого иммунитета на формирование и поддержание в норме фертильных свойств сперматозоидов [Hedger M. P., 2011; Zhou L., 2021; Nowicka-Bauer, K. 2022]. Однако на сегодняшний день ещё отсутствует целостное понимание того, как именно врождённый иммунитет опосредует нарушение фертильности сперматозоидов.

#### **Цель исследования**

Изучение особенностей факторов врождённого иммунитета у мужчин с идиопатическим бесплодием и варикоцеле.

### Задачи исследования

1. Провести комплексную оценку противомикробных пептидов  $\beta$ -дефензинов HBD1 и HBD126 на уровне экспрессии генов в сперматозоидах и содержания их белковых продуктов в семенной плазме мужчин исследуемых групп;
2. Проанализировать распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* у пациентов с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров;
3. Определить экспрессию генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* в сперматозоидах и содержание белкового продукта HSP70 в семенной жидкости пациентов с бесплодием и здоровых мужчин;
4. Оценить экспрессию генов паттерн-распознающих рецепторов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах мужчин исследуемых групп в сравнении со здоровыми донорами;
5. Провести анализ концентрации провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 $\beta$ , IL-18 в семенной жидкости мужчин с бесплодием;
6. Определить иммунологически значимые маркеры, ассоциированные со снижением мужской репродуктивной функции при ИДБ и варикоцеле.

### Научная новизна

В настоящей работе впервые у мужчин с бесплодием проведено комплексное исследование показателей ВИ в зависимости от этиологии заболевания (идиопатическое бесплодие и варикоцеле) и степени тяжести астенозооспермии (тяжёлая, умеренно выраженная и лёгкая) как по сравнению с группой здоровых доноров, так и между группами больных.

В результате проведенного исследования впервые было продемонстрировано, что повышенная экспрессия генов мембранных рецепторов *TLR2* и *TLR4* и сниженная экспрессия генов *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* в сперматозоидах, увеличение концентрации в семенной жидкости пептидов HSP70, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF и снижение выработки  $\beta$ -дефензинов HBD1 и HBD126 ассоциированы с развитием идиопатической астенозооспермии.

Получены новые данные по выявлению носительства мутантного аллеля *del* (rs11468374) гена *HBD126* среди мужчин московской популяции и его ассоциации с идиопатическим бесплодием. Среди мужчин с ИДБ частота носительства аллеля *del* возрастает в 2,3 раза в сравнении со здоровыми донорами.

Продемонстрировано комплексное повышение экспрессии генов *HSP70*, *HSP90*, *TLR4* и концентрации факторов врождённого иммунитета HSP70, IL-18, TNF, коррелирующее с нарушением функциональной активности сперматозоидов при варикоцеле, выраженном в снижении их подвижности и количестве в эякуляте.

### Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан новый подход для оценки ВИ при мужском бесплодии на локальном уровне,

основанный на определении в сперматозоидах экспрессии генов *HBD1*, *HBD126*, *TLR2*, *TLR4*, *HSP70*, *HSP60*, *HSP90* и концентрации пептидов HSP70, HBD1, HBD126, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-18 в семенной жидкости. Выявленный дисбаланс факторов ВИ может служить основой для создания панели диагностических маркеров и предложить новые мишени для таргетной терапии бесплодия.

Предложен новый способ оценки репродуктивной функции мужчин с ИДБ, позволяющий конкретизировать причину нарушения фертильности, основанный на определении экспрессии и носительства мутантного аллеля гена *HBD126* (rs11468374) в сперматозоидах и концентрации пептида HBD126 в семенной жидкости.

#### **Методология и методы исследования**

В исследовании приняли участие пациенты с идиопатическим бесплодием и варикоцеле. У пациентов основных групп и группы сравнения получали образцы эякулята, разделённые на клеточную фракцию сперматозоидов и семенную жидкость. В сперматозоидах определяли экспрессию генов *HBD1*, *HBD126*, *TLR2*, *TLR4*, *HSP70*, *HSP60*, *HSP90* методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией и носительство полиморфного аллеля rs11468374 гена *HBD126* методом аллель-специфической ПЦР. В семенной жидкости определяли концентрации пептидов HSP70, HBD1, HBD126 методом твердофазного иммуноферментного анализа и цитокинов TNF, IL-1 $\beta$ , IL-18 методом мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа.

#### **Личный вклад**

Автором самостоятельно были выполнены: выбор направления исследования диссертационной работы, анализ и работа с литературными источниками, разработка дизайна исследования, формулирование цели и задач, выделение нуклеиновых кислот из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени, проведение иммуноферментного и мультиплексного анализа, статистическая обработка данных с последующей интерпретацией и формулированием выводов. Автор лично участвовал в подготовке всех публикаций по выполненной работе, в апробации результатов исследования, лично написал и оформил данную рукопись.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. При идиопатическом бесплодии у мужчин выявлено нарушение продукции противомикробных пептидов HBD1 и HBD126, обеспечивающих подвижность сперматозоидов и их защиту от агрессивных факторов окружающей среды. Нарушения проявлялись в снижении в сперматозоидах экспрессии генов *HBD1* и *HBD126* и концентрации кодируемых ими пептидов в семенной жидкости, коррелирующие со степенью выраженности астенозооспермии. Показаны различия в частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера гена *HBD126* (rs11468374) в группе мужчин с ИДБ и здоровых доноров. Носительство мутантного аллеля *del*

ассоциировано с повышенным риском развития бесплодия, в то время как среди здоровых мужчин неблагоприятный генотип *HBD126 del/del* обнаружен не был. Носительство неблагоприятного аллеля в гомозиготном положении сопровождалось снижением экспрессии гена в 19,6 раз и снижением концентрации пептида HBD126 в 14,7 раза в сравнении со здоровыми донорами нормального генотипа.

2. У пациентов с идиопатическим бесплодием обнаружен дисбаланс факторов врождённого иммунитета, проявляющийся в гиперэкспрессии генов *TLR2* и *TLR4*, снижении экспрессии генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и увеличении в семенной плазме концентрации белков HSP70, IL-1 $\beta$ , IL-18 и TNF. Изменения в системе ВИ сопровождались нарушением фертильной функции сперматозоидов, выраженным в снижении их подвижности и концентрации в эякуляте.

3. У пациентов с варикоцеле выявлены иммунологически значимые молекулярно-генетические маркеры ВИ, ассоциированные со снижением фертильного потенциала сперматозоидов: увеличение в сперматозоидах экспрессии генов *HSP60* и *HSP90* более, чем в 3 раза, *TLR4* в 12,5 раза и повышение концентрации в семенной жидкости IL-18 выше 40 и TNF выше 140 пг/мл.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Направление диссертационного исследования соответствует п.2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п.4 «Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении, нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.)», п.6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» паспорта специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточной выборкой пациентов, включенных в исследование, использованием современных методов исследования, соответствующих поставленным цели и задачам. Различия считались статистически достоверными при значении  $p < 0,05$ . Выводы и практические рекомендации подкреплены данными, представленными в таблицах и рисунках, соответственно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на научных заседаниях кафедры иммунологии МБФ и представлены на научной конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology», (Москва, 2021г.), конгрессе Европейской академии аллергии и клинической иммунологии EAACI Hybrid Congress 2021 (Madrid-Krakov, 2021г.), конкурсе молодых ученых XXII Всероссийского научно-образовательного форума Мать и Дитя (Москва, 2021г.), конкурсе

молодых ученых в рамках Международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС 2021, (Москва, 2021г.), Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием «Медицинская весна-2021» (Москва, 2021г.).

Основные результаты работы внедрены в учебный и научный процесс кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, используются в чтении лекций и проведении практических занятий со студентами старших курсов медико-биологического, лечебного и педиатрического факультетов, ординаторов и аспирантов.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of science; 1 патент РФ на изобретение, 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 182 библиографических источника (11 отечественных и 171 зарубежных). Работа изложена на 140 страницах, содержит 12 таблиц и 11 рисунков.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материал и методы исследования.** В настоящей работе исследовали эякулят здоровых доноров и пациентов с ИДБ и бесплодием при варикоцеле. В исследование было включено 84 пациента с диагнозом «идиопатическое бесплодие» и 38 пациентов с диагнозом «варикоцеле» в возрасте 24-45 лет. Группу сравнения составили 45 мужчин репродуктивного возраста без нарушения фертильной функции. Материал для исследования и анкеты пациентов были получены из клиники репродуктивной медицины «ВитроКлиник» (руководитель сети центров репродукции, врач-репродуктолог, к.м.н. Базанов П.А.), где пациенты консультировались по причине бесплодия и проходили первичную оценку эякулята в рамках спермограммы.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), и было одобрено локальным этическим комитетом при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (протокол заседания №192 от «27» января 2020 г.). В установленном порядке пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных.

**Критерии включения** в исследование: мужской фактор бесплодия неустановленного



генеза или наличие варикоцеле, репродуктивный возраст испытуемых (24-45 лет), согласие на участие в исследовании.

**Критериями исключения** являлись: наличие острых и обострения хронических заболеваний, паховой грыжи и других заболеваний, негативно влияющих на репродуктивную функцию, установленный женский фактор бесплодия в паре, несоблюдение правил подготовки к сдаче эякулята, отказ от участия в исследовании.

Разделение цельного эякулята на фракцию сперматозоидов и семенную жидкость проводили методом центрифугирования эякулята в градиенте плотностей с использованием коммерческого набора «SPERMGRAD™» (Vitrolife Sweden AB) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, 2012]. Из клеточной фракции сперматозоидов выделяли нуклеиновые кислоты с помощью «Набора для выделения ДНК/РНК из клинического материала» (ИнтерЛабСервис, Россия) для определения полиморфизма гена *HBD126* и экспрессии генов *TLR2/4*, *HSP60/70/90*, *HBD1/126*.

**Оценка экспрессии генов: метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Для постановки реакции обратной транскрипции использовали «Набор для проведения обратной транскрипции (ОТ)» (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Далее проводили ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green (Rotor-Gene Q, QIAGEN Hiden, Germany). Праймеры и реактивы для ПЦР реакции были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Экспрессию целевых генов нормализовали на ген домашнего хозяйства  $\beta$ -актина *ACTB*, оценивали по методу  $\Delta\Delta C_t$  [Ребриков Д.В., 2009].

**Анализ генотипа *HBD126* rs11468374** сперматозоидов мужчин с бесплодием и доноров группы сравнения проводили с использованием выделенной геномной ДНК в качестве матрицы в аллель-специфической ПЦР с использованием пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных для аллелей дикого типа (WT, wild type) и для делеции (DEL, deletion).

**Концентрацию** противомикробных пептидов HBD1 и HBD126 и белка теплового шока HSP70 в семенной жидкости определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовались коммерческие наборы для ИФА фирм Enzo Life Science Inc., Switzerland и Cloud-Clone Corp., USA. Результаты учитывали на микропланшетном фотометре Anthos 2020 (BCA, Lowry, Bradford) при длине волны 450 нм.

**Концентрацию цитокинов** IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF в семенной жидкости определяли методом мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа (Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader, USA) с помощью набора Bio-Plex Pro Assays по протоколу фирмы-производителя.

**Статистические методы обработки полученных данных.** Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 9.0.0. Для выборок, подчиняющихся нормальному

распределению, сравнение исследуемых групп проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Для выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, применяли критерий Краскела-Уоллиса, апостериорное сравнение проводили с помощью критерия Данна для множественных сравнений. Корреляционный анализ проводился с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Частоту встречаемости мутантного аллеля и аллеля дикого типа гена *HBD126* определяли прямым подсчетом. Для оценки степени различий в частоте встречаемости генотипов между исследуемыми группами использовался точный критерий  $\chi^2$  Пирсона. При этом рассчитывали коэффициент отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (DI), а также р-значение. Различие показателей считалось достоверным при уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Перед нами стояла задача исследовать показатели ВИ на локальном уровне у мужчин с бесплодием различной этиологии. Для этого был разработан комплексный подход, включающий:

1. Определение экспрессии и концентрации  $\beta$ -дефензинов HBD1 и HBD126, а также носительства мутации гена *HBD126*.
2. Оценку распознающих рецепторов TLR2 и TLR4.
3. Оценку белков теплового шока HSP60, HSP70, HSP90.
4. Определение концентрации эффекторных молекул - провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF.
5. Исследование ассоциации выявляемых изменений в системе ВИ с нарушениями в параметрах спермограмм пациентов.

#### **Анализ функциональных параметров сперматозоидов пациентов**

На первом этапе исследования нами были проанализированы параметры спермограмм пациентов с ИДБ ( $n = 84$ ), и по результатам этого анализа испытуемые были разделены на 3 группы в зависимости от степени выраженности астенозооспермии:

1. Пациенты с нормозооспермией или незначительно выраженной АЗС,  $n=27$ , (подвижность сперматозоидов составляла 41-50%);
2. Пациенты с умеренно выраженной степенью АЗС,  $n=31$ , (подвижность сперматозоидов составляла 30-40%);
3. Пациенты с тяжелой степенью АЗС,  $n=26$ , (подвижность сперматозоидов - 1-29%).

Параметры спермограмм исследуемых групп мужчин приведены в таблице 1. Показатели подвижности и концентрации сперматозоидов в эякуляте мужчин гр.1 и группы сравнения были сопоставимы. Мы определили, что подвижность сперматозоидов фертильных доноров достоверно выше в 3,7 раза этого показателя пациентов гр.3 ( $p \leq 0,01$ ). Морфологическое строение сперматозоидов пациентов всех исследуемых групп имело значимые отличия в

сравнении с показателями здоровой группы ( $p < 0,01$ ). Эякулят бесплодных мужчин гр.3 демонстрировал содержание наименьшего количество сперматозоидов нормальной морфологии ( $p < 0,001$ ). В гр. 3 концентрация сперматозоидов была ниже в 6 раз в сравнении с гр.1 и фертильными донорами ( $p < 0,01$ ).

Таблица 1 – Функциональные параметры сперматозоидов исследуемых групп мужчин с идиопатическим бесплодием и доноров группы сравнения

Параметр	Группа мужчин с идиопатическим бесплодием			Группа сравнения
	Гр.1	Гр.2	Гр.3	
Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6$ /мл	123 (68; 150)	80 (57; 88)*	21 (19,5; 32)**	138 (79,5; 305)
Подвижность сперматозоидов, (А+В),%	45 (41; 48)	35 (33,5; 37)**	13 (9; 17)**	49 (45; 50)
Морфология сперматозоидов, %	15 (11; 19)**	11 (10; 18)**	11 (2; 15)**	30 (28; 30)

Примечания: данные представлены в виде Me (Q1; Q3);

\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,05$ ;

\*\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,01$ .

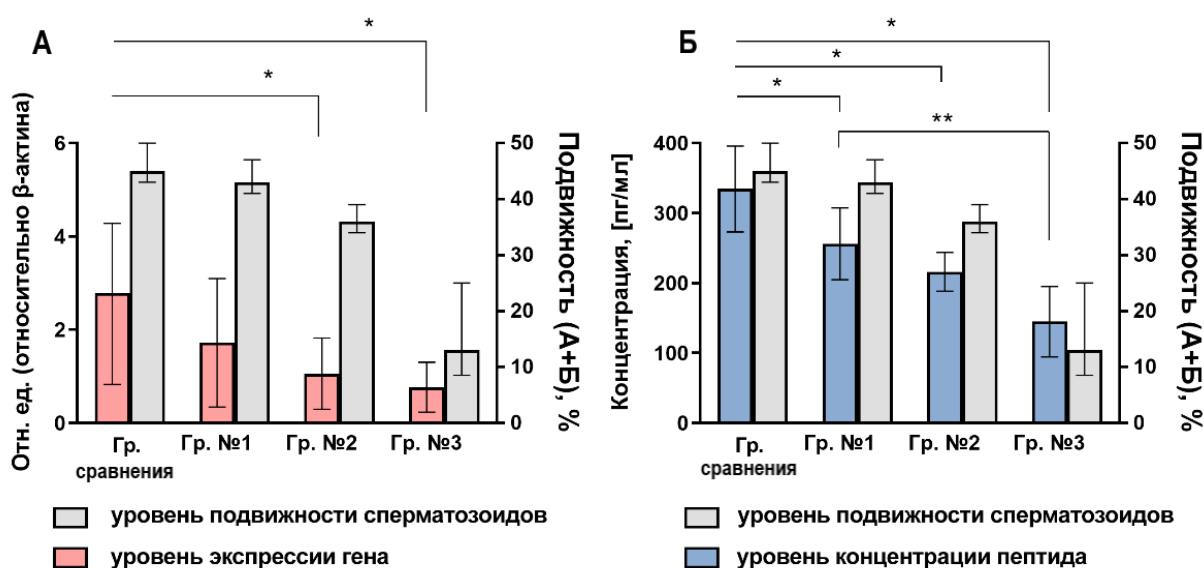
Проведение спермограммы и ее интерпретация являются общепризнанным и оптимальным способом оценки репродуктивной функции, однако этот метод не позволяет установить причину бесплодия неясного генеза и не учитывает биохимические особенности сперматозоидов, и потому её результаты не всегда являются надежными. Таким образом, наша дальнейшая работа была посвящена поиску биохимических и молекулярно-генетических маркеров снижения фертильной функции сперматозоидов.

#### **Снижение экспрессии генов *HBD1* и *HBD126* в сперматозоидах и концентрации кодируемых ими пептидов в семенной жидкости у пациентов с идиопатическим бесплодием**

На следующем этапе работы была изучена экспрессия генов *HBD1* и *HBD126* в сперматозоидах и концентрация кодируемых ими пептидов в семенной жидкости мужчин с ИДБ и здоровых доноров (рисунок 1 А, Б). Исследуемые ПМП играют принципиальную роль в формировании подвижности сперматозоидов, защиты от патогенов и сокрытии антигенов сперматозоидов от факторов иммунной системы.

Мы показали, что экспрессия гена *HBD1* в сперматозоидах достоверно снижена в исследуемых группах пациентов в сравнении со здоровыми донорами (рисунок 1, А): в 3 раза в гр. 2 ( $p < 0,01$ ) и в 4 раза в группе 3 ( $p < 0,001$ ). Концентрация *HBD1* в семенной плазме здоровых мужчин составила ( $334,6 \pm 61,25$ ) пг/мл. Измерение уровней этого пептида у мужчин с ИДБ показало, что его концентрация снижается в 1,3 раза в гр.1 ( $p < 0,05$ ), в 1,5 раза в гр. 2 ( $p < 0,01$ ) и в гр.3 в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ) в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 1, Б). Значение

коэффициента Спирмена составило  $R=0,74$  ( $p<0,05$ ), что соответствует высокой силе связи между снижением концентрации HBD1 и подвижности сперматозоидов.



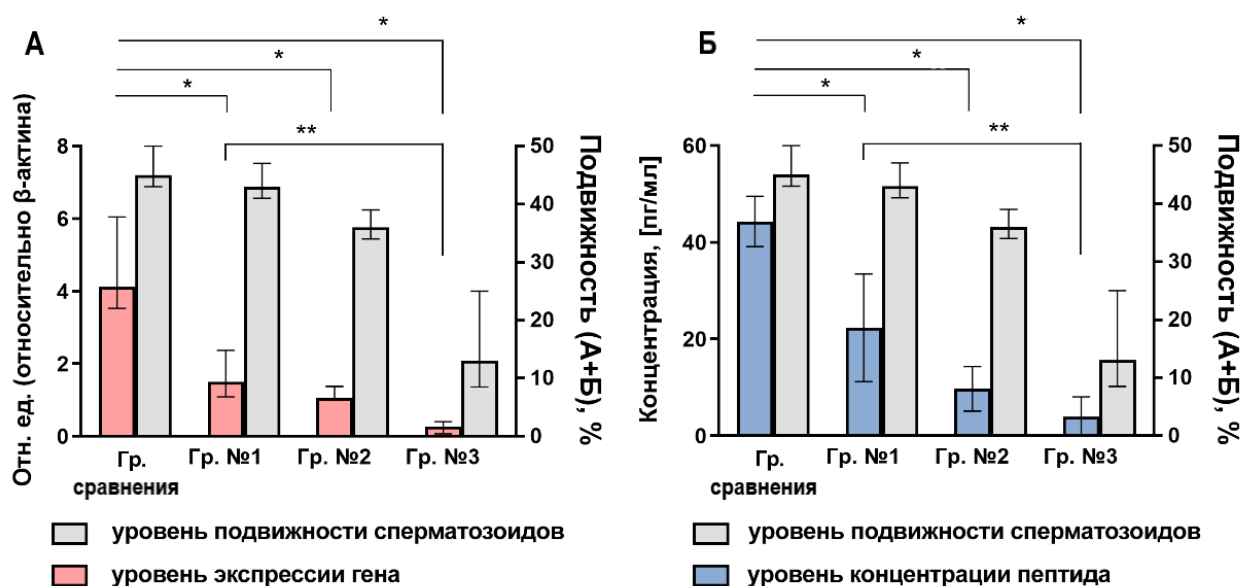
Примечания: \* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,05$ ; \*\* - статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ,  $p \leq 0,05$ .

Здесь и далее: Гр.1 – пациенты с ИДБ с нормозооспермией или незначительной АЗС (41-50%); Гр.2 – пациенты с ИДБ с умеренно выраженной АЗС (30-40%); Гр.3 – пациенты с ИДБ с тяжелой степенью АЗС (0-29%). Гр. сравнения – фертильные доноры эякулята.

Рисунок 1 – Экспрессия гена *HBD1* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида HBD1 в семенной жидкости (Б) у мужчин с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров.

Обнаружено достоверное снижение экспрессии гена *HBD126* во всех исследуемых группах: в гр. 1 в 3 раза ( $p<0,01$ ), в гр. 2 в 4 раза и в гр. 3 в 16 раз ( $p<0,001$ ) в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 2, А). Уровни экспрессии гена *HBD126* достоверно отличались внутри групп мужчин с ИДБ ( $p<0,01$ ). Значение коэффициента Спирмена составило  $R=0,817$ , ( $p<0,05$ ), что соответствует высокой силе связи между снижением уровня экспрессии гена *HBD126* и подвижности сперматозоидов.

Концентрация в семенной жидкости пептида HBD126 у здоровых мужчин составила ( $44,33 \pm 5,2$ ) пг/мл (рисунок 2, Б). В гр.1 наблюдалось её снижение в 2 раза ( $p<0,01$ ), в гр.2 в 4,6 раза, и в гр.3 в 11 раз ( $p<0,001$ ) в сравнении со здоровыми мужчинами. Концентрация HBD126 в семенной плазме мужчин с бесплодием достоверно снижалась в зависимости от уровня снижения подвижности их сперматозоидов ( $p<0,001$ ). Корреляционный анализ взаимосвязи между снижением концентрации HBD126 в семенной жидкости и подвижности сперматозоидов выявил высокий уровень связи,  $R=0,84$  ( $p<0,05$ ).



Примечания: статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,05$ ;

\*\* - статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ,  $p \leq 0,05$

Рисунок 2 – Экспрессия гена *HBD126* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида HBD126 в семенной жидкости (Б) у мужчин с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров.

Уникальным свойством дефензинов, входящих в состав структуры гликокаликса сперматозоидов, является их способность регулировать CCR6-зависимую мобилизацию ионов кальция, что увеличивает их подвижность [Zurin L., 2019]. Мы продемонстрировали, что степень снижения экспрессии генов и содержание пептидов HBD1 и HBD126 коррелируют со степенью выраженности АЗС. Данный результат согласуется с известными литературными данными: пациенты с олигоастенозооспермией имели более низкие уровни концентрации пептида HBD1 в семенной жидкости в сравнении с пациентами с нормозооспермией [Diao, R., 2014].

Дефензин HBD126 входит в состав структуры гликокаликса сперматозоидов, обеспечивает их миграцию, защищает от факторов агрессии окружающей среды, и др. В работах Т. Tollner обсуждается роль  $\beta$ -дефензина HBD126 в развитии мужского бесплодия [Tollner T.L., 2011]. В структуре гена человека *HBD126* была идентифицирована двунуклеотидная делеция (rs11468374), предположительно ассоциированная с идиопатической формой бесплодия у мужчин [Tollner T.L., 2014; Boroujeni P. B., 2019; Aram R., 2020]. В связи с этим особой задачей нашего исследования явилось изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* и ассоциации носительства неблагоприятного аллеля *del* с уровнем его экспрессии в сперматозоидах и концентрацией его белка в семенной жидкости пациентов с ИДБ.

#### Анализ распределения полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* у мужчин с идиопатическим бесплодием

Нами было проанализировано носительство полиморфизма rs11468374 гена *HBD126* у

пациентов с ИДБ и фертильных доноров эякулята среди мужчин московской популяции. Среди обследованных мужчин с ИДБ носителями мутантного аллеля в гетерозиготном положении (генотип *HBD126 wt/del*) явились 49 мужчин, в гомозиготном положении (*del/del*) – 15 мужчин, не обнаружена мутация (*wt/wt*) у 20 пациентов (таблица 2).

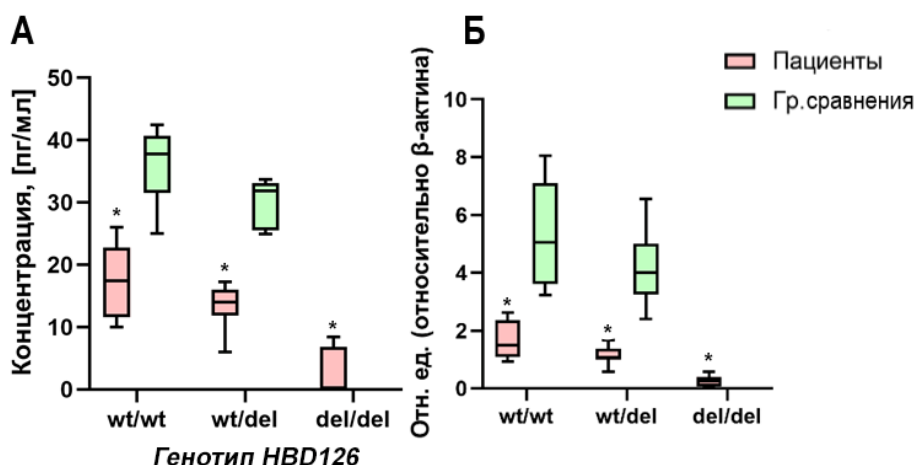
Таблица 2 – Частоты распределения аллелей и генотипов гена *HBD126* по полиморфному маркеру rs11468374 в обследуемых группах мужчин

Обследуемая группа	Аллель		Генотип					
	wt	del	wt/wt		wt/del		del/del	
	%	%	n	%	n	%	n	%
Мужчины с бесплодием	53	47	20	24	49	58	15	18
Гр. сравнения	80	20	27	60	18	40	0	0

Среди фертильных доноров мутация в гетерозиготном состоянии обнаружена у 18 мужчин, генотип дикого типа был выявлен у 27 человек. Примечательно, что мутантный генотип *del/del* был обнаружен только среди пациентов с бесплодием, мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении (*del/del*) среди группы сравнения обнаружено не было. Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 среди обследованных соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга ( $\chi^2=2,45$ ,  $p=0,117$  в основной группе и  $\chi^2=2,81$ ,  $p=0,09$  в группе сравнения). У пациентов с нарушением фертильной функции в сравнении с группой здоровых доноров частота встречаемости мутантного аллеля *del* в популяции возрастает в 2,3 раза – с 20% до 47%. Генотип *HBD126 wt/wt* встречается в 2,5 раза чаще среди здоровых доноров в сравнении с мужчинами с идиопатической формой бесплодия. Достоверное увеличение частоты носительства мутантного аллеля *del* в основной группе пациентов ( $\chi^2=16,57$ ,  $p < 0,001$ , OR=4,8; 95% CI 2,201-10,462) свидетельствует об ассоциации данного аллеля с повышенным риском нарушения репродуктивной функции мужчин.

Далее мы оценивали, как меняется концентрация пептида HBD126 в семенной жидкости и экспрессия гена *HBD126* в сперматозоидах в зависимости от генотипа по полиморфному маркеру rs11468374 (рисунок 3 А, Б).

Носительство неблагоприятного аллеля *del* гена *HBD126* достоверно ассоциировано со снижением концентрации HBD126 в семенной жидкости пациентов с генотипом *wt/del* в 2,7 раза, и у пациентов с генотипом *del/del* в 14,7 раза в сравнении со здоровыми донорами эякулята с генотипом *wt/wt* ( $p < 0,01$ ). Примечательно, что у пациентов, не являющихся носителями мутации, наблюдалось снижение концентрации пептида в семенной жидкости в 2 раза ( $p < 0,05$ ) в сравнении со здоровыми донорами генотипа *wt/wt* (рисунок 3, А).



Примечание: \*- статистически значимое отличие групп пациентов с ИДБ от доноров группы сравнения с генотипом *wt/wt*,  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 3 — Концентрация пептида HBD126 в семенной жидкости (А) и экспрессия гена HBD126 в сперматозоидах (Б) мужчин с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров в зависимости от генотипа по полиморфному маркеру rs11468374.

При изучении влияния носительства мутации rs11468374 гена *HBD126* на уровень его экспрессии было обнаружено, что среди носителей мутации в гомозиготном положении (генотип *del/del*) экспрессия была снижена в 19,6 раз в сравнении со здоровыми донорами генотипа *wt/wt* ( $p < 0,001$ ). Экспрессия в группе больных с генотипом *wt/del* достоверно снижена в 5 раз в сравнении с донорами с генотипом *wt/wt* ( $p < 0,01$ ). В группе пациентов с генотипом *wt/wt* уровень экспрессии гена *HBD126* был снижен в 3,2 раза в сравнении с группой здоровых мужчин с таким же генотипом ( $p < 0,01$ ) (рисунок 3, Б).

Было показано, что у пациентов с генотипом *HBD126 del/del* наблюдается наиболее выраженная АЗС: подвижность сперматозоидов снижена в 5,2 раза в сравнении с показателем подвижности среди здоровых доноров генотипа *wt/wt* ( $p < 0,01$ ). Подвижность сперматозоидов пациентов с нарушением фертильной функции и нормальным генотипом *HBD126 wt/wt* снижена незначительно. Таким образом, носительство неблагоприятного гомозиготного генотипа *HBD126 del/del* достоверно ассоциировано со развитием АЗС ( $\chi^2=9,902$ ,  $p=0,008$ ).

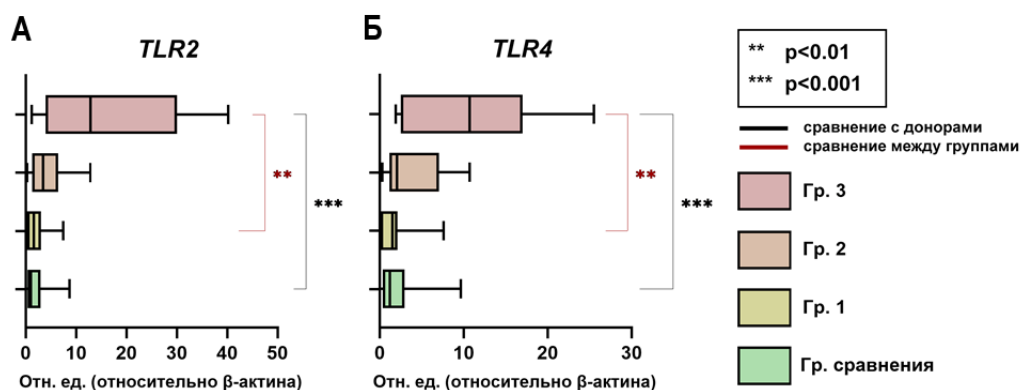
Носительство мутации rs11468374 гена *HBD126* ведет к формированию дефектной структуры гликокаликса клеток. Как сообщают в своей работе T.L. Tollner et al., мутантный аллель *del* гена *HBD126* встречается с высокой частотой как в европейской (0,47), так и китайской (0,45) популяциях [Tollner T.L., 2011]. В проведенном нами исследовании среди мужчин московской популяции частота встречаемости мутантного аллеля составила 0,47. Можно сделать вывод о том, что мутация гена *HBD126* является широко распространенным полиморфизмом в различных популяционных когортах. Вероятно, большое количество гетерозигот, несущих мутантный аллель, объясняет снижение уровней как экспрессии гена, так и концентрации этого β-дефензина, в сперматозоидах и семенной жидкости.

Также важно отметить, что в проведенном нами исследовании среди здоровой группы

не было обнаружено фертильных доноров с генотипом *del/del*, а у носителей мутации в гетерозиготном положении подвижность сперматозоидов была ниже в сравнении с донорами с генотипом *wt/wt*, что подтверждает тот факт, что носительство мутантного аллеля ассоциировано с нарушением фертильной функции. Однако у пациентов с генотипом *wt/wt* также наблюдалось снижение как экспрессии гена в сперматозоидах, так и концентрации пептида HBD126 в семенной жидкости. Можно предположить, что причинами снижения экспрессии в данной случае являются механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и влияние микроРНК, или носительство этими пациентами других неблагоприятных полиморфных вариантов гена HBD126, что требует дальнейшего изучения.

### Гиперэкспрессия генов *TLR2*, *TLR4* в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием

Исследование уровней экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* обосновано тем фактом, что на поверхности сперматозоидов определены функционально активные рецепторы TLR2 и TLR4, распознающие широкий спектр PAMP и DAMP [Zhu X., 2015]. Известно, что TLR2 активируется в ответ на связывание белков теплового шока HSP70 и HSP90, а TLR4 – при связывании HSP60 и HSP70. Кроме того, было продемонстрировано, что ядерные гены сперматозоидов экспрессируются в виде белков митохондриальными рибосомами даже после созревания и эякуляции, и значение их экспрессии меняется в зависимости от внешних условий, действующих на клетки [Gur Y., 2008].



*Примечание: \*\* - статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ,  $p < 0,01$ ; \*\*\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p < 0,001$ .*

Рисунок 4 – Экспрессия гена *TLR2* (А) и *TLR4* (Б) в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием с разной степенью астенозооспермии и доноров группы сравнения. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3), min-max.

Наибольшая разница между уровнями экспрессии гена *TLR2* была показана для пациентов гр.3 и здоровых мужчин, она составила повышение в 12 раз ( $p < 0,001$ ) (рисунок 4, А). Экспрессия *TLR2* была выше в гр. 3 в сравнении с пациентами гр. 1 в 8 раз ( $p < 0,01$ ).



Выраженная гиперэкспрессия гена *TLR4* наблюдалась среди мужчин гр. 3 в сравнении со здоровыми донорами, повышение составило 8,7 раза ( $p < 0,001$ ) (рисунок 4, Б). Также наблюдалось выраженное увеличение уровня экспрессии *TLR4* в гр. 3 в сравнении с гр. 1 в 7 раз ( $p < 0,01$ ).

Наибольшее повышение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* было характерно для группы пациентов с тяжелой степенью АЗС. Значение коэффициента Спирмена составило  $R = -0,56$ , что соответствует заметной степени связи между признаками (экспрессия *TLR2* и подвижность сперматозоидов); и  $R = -0,501$  для связи между экспрессией *TLR4* и подвижностью ( $p < 0,05$ ). Суммируя полученные данные, можно предположить, что повышение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах ассоциировано с развитием идиопатической астенозооспермии.

Связь между активацией *TLR2* и *TLR4* и ухудшением фертильности сперматозоидов была продемонстрирована в работе Y. Fujita et al. Авторы сообщают, что при действии на сперматозоиды экзогенными лигандами *TLR2/4* пептидогликаном и ЛПС наблюдалось значительное снижение их подвижности, индукция апоптоза сперматозоидов, и снижение успешности оплодотворения яйцеклетки сперматозоидами *in vivo* и *in vitro* [Fujita Y., 2011].

#### Анализ экспрессии генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и концентрации *HSP70* в семенной жидкости мужчин с идиопатическим бесплодием

Поскольку известно, что белки теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* широко вовлечены в поддержание сперматогенеза в качестве молекулярных шаперонов с одной стороны, а с другой – являются эндогенными сигналами опасности и лигандами рецепторов *TLR2* и *TLR4*, на следующем этапе исследования нами были оценены экспрессия генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и концентрация белка *HSP70* в семенной жидкости мужчин с ИДБ.

Полученные данные по экспрессии генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Экспрессия генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах мужчин с ИДБ и доноров группы сравнения

Показатель \ Группа		Гр. сравнения	Пациенты с идиопатическим бесплодием		
			1 группа	2 группа	3 группа
Экспрессия исследуемого гена (отн. ед.)	<i>HSP60</i>	2,5 (1,55; 4,3)	3,04 (0,96; 5)	0,92 (0,56; 2)*	0,75 (0,25; 1,55)**
	<i>HSP70</i>	2,83 (1,4; 4)	2,7 (1,4; 4,7)	2,75 (1,05; 3,4)	0,54 (0,24; 1,45)**
	<i>HSP90</i>	3,4 (0,62; 6,7)	1,24 (0,74; 4,14)	0,79 (0,44; 2,67)	0,47 (0,1; 2,3)**

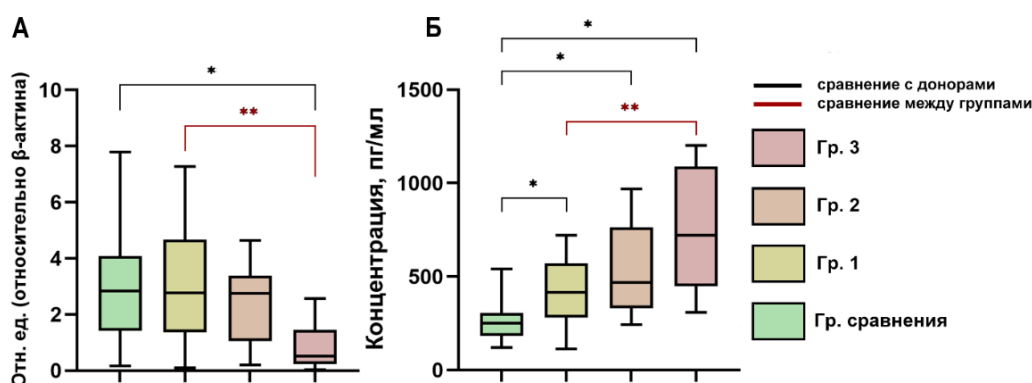
Примечания: данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,05$ ; \*\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,01$ .

Достоверных отличий между гр. 1 и здоровыми мужчинами обнаружено не было для всех трёх целевых генов. Экспрессия гена *HSP60* у пациентов гр.3 была достоверно снижена в 3,3 раза по сравнению с фертильными донорами ( $p < 0,01$ ). У пациентов гр.2 экспрессия *HSP60* оказалась ниже, чем у группы сравнения, в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ). Продемонстрирована заметная положительная связь между уровнем экспрессии гена *HSP60* и концентрацией сперматозоидов в эякуляте,  $R=0,511$ ,  $p < 0,05$ . Полученный нами результат согласуется с данными работы Werner et al., где было показано, что низкое количество сперматозоидов, экспрессирующих *HSP60*, было ассоциировано с нарушением их сперматогенной функции и развитием бесплодия [Werner A., 1997].

Достоверное снижение экспрессии гена *HSP90* было обнаружено в гр.3 в 7 раз ( $p < 0,01$ ) и в гр. 2 в 4 раза ( $p < 0,05$ ). Полученные нами данные согласуются с исследованием, продемонстрировавшими значительные изменения в локализации и экспрессии *HSP90* в сперматозоидах пациентов с олигоастенозооспермией [Zhou L., 2021].

Сообщается, что дефицит *HSP70* приводит к недостаточности функционирования синаптомембранного комплекса и остановке сперматогенеза в профазе I мейоза и, как следствие, к снижению фертильной функции [Erata G.O., 2008]. В то же время этот белок является эндогенным сигналом опасности DAMP и лигандом для рецепторов TLR2/4, вырабатывается клетками при воздействии факторов стресса, и определяется в семенной жидкости. Таким образом, внутриклеточный *HSP70* играет важную роль в сперматогенезе, а его внеклеточная форма, обнаруживаемая в семенной жидкости, в избытке способна привести к гиперактивации TLR2 и TLR4 сперматозоидов и ухудшению их фертильных свойств. В связи с этим нами были изучены уровни экспрессии гена и концентрации белка *HSP70* в семенной жидкости мужчин с ИДБ и группы здоровых доноров (рисунок 5).



Примечания: \*- статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,05$ ; \*\* - статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ,  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 5 – Экспрессия гена *HSP70* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида *HSP70* в семенной жидкости (Б) мужчин с ИДБ и здоровых доноров.

Уровни экспрессии *HSP70* у пациентов гр. 1, гр. 2 и здоровых доноров были сопоставимы. В гр.3 экспрессия *HSP70* была снижена в 5,6 раза относительно здоровых доноров ( $p<0,01$ ) и в 5,5 раз относительно гр.1 (рисунок 5, А).

Содержание *HSP70* в семенной жидкости пациентов гр.3 составило ( $740,8 \pm 315,4$ ) пг/мл, что в 3 раза превышало концентрацию в гр. сравнения ( $p<0,001$ ) (рисунок 5, Б). В сравнении со здоровыми мужчинами наблюдалось повышение концентрации в 1,6 раза в гр.1 ( $p<0,05$ ) и в 2 раза в гр.2 ( $p<0,01$ ). Была выявлена заметная отрицательная сила связи между показателями подвижности сперматозоидов и концентрацией *HSP70*,  $R=-0,609$ ; и умеренная отрицательная связь между количеством сперматозоидов и концентрацией *HSP70*,  $R=-0,415$  ( $p<0,05$ ).

Необходимость участия *HSP70* в формировании фертильности сперматозоидов подчеркнута в исследовании, показавшем, что подавление экспрессии гена *HSP70* ведёт к нарушению прохождения мейоза, апоптозу зародышевых клеток и развитию бесплодия [Neuer A., 2000]. Это согласуется с полученными нами данными: гр. пациентов 3, продемонстрировавшая наибольшее снижение экспрессии *HSP70*, характеризуется сниженным показателем концентрации сперматозоидов в эякуляте в сравнении с донорами фертильной группы ( $p<0,01$ ). Однако в других работах сообщается о повышении уровней *HSP70* в эякуляте в ответ на тепловое воздействие с последующим нарушением сперматогенеза, снижением качества сперматозоидов и фрагментации их ДНК [Erata G.O., 2008]. Мы продемонстрировали снижение экспрессии гена *HSP70* в сперматозоидах пациентов с тяжелой степенью АЗС, в то время как концентрация белка *HSP70* в семенной жидкости пациентов всех трёх групп возрастала. Вероятным объяснением может являться имеющееся нарушение экспрессии гена *HSP70* именно половыми клетками при нормальной или усиленной выработке пептида *HSP70* эпидидимальными секреторными клетками.

#### **Изменения концентрации провоспалительных цитокинов в семенной плазме мужчин с идиопатическим бесплодием**

Поскольку любые нарушения со стороны мужского репродуктивного тракта ассоциированы со значительными биохимическими изменениями в составе семенной плазмы, влияющими на жизнедеятельность и фертильность сперматозоидов, на следующем этапе исследования мы оценивали уровни концентраций провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF в семенной жидкости мужчин с ИДБ.

Концентрация IL-1 $\beta$  в семенной жидкости здоровых мужчин практически не определялась (таблица 4). При этом в семенной жидкости пациентов гр.3 ее уровень составил 21 пг/мл, что превысило концентрацию IL-1 $\beta$  в семенной плазме пациентов гр. 1 в 6 раз ( $p<0,01$ ). Достоверное увеличение концентрации было также обнаружено среди пациентов гр.2 и гр. 3 в относительно фертильных доноров в 9 и 19 раз, соответственно ( $p<0,01$ ).

Таблица 4 – Концентрация IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF в семенной жидкости у мужчин с идиопатическим бесплодием

Исследуемая группа		Гр. сравнения	Пациенты с идиопатическим бесплодием		
			1 группа	2 группа	3 группа
Показатель	IL-1 $\beta$	1,1 (0,3; 3,1)	3,3 (2,56; 5,8)**	10 (8,6; 12,4)*	21 (16; 26)*
	IL-18	17,4 (7,7; 34,6)	27,4 (10; 34)**	55 (28,8; 106)	278(169; 332)*
	TNF	6,24 (5; 9,7)	12 (10; 13,75)**	21(17,2; 26,2)*	51,5(48; 56,5)*

Примечания: данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

\* - статистически значимое отличие от группы сравнения,  $p \leq 0,01$ ; \*\* - отличие от группы пациентов 3,  $p \leq 0,01$ .

Концентрация IL-18 в семенной плазме пациентов гр.3 составила 278 пг/мл, что в 16 раз ( $p < 0,01$ ) превышало её уровень в гр. сравнения. Уровни концентрации IL-18 среди пациентов гр.1 и здоровых доноров достоверно не отличались. В гр. 3 разница составила 10-кратное повышение в сравнении с гр. 1 ( $p < 0,01$ ).

Концентрация TNF в семенной жидкости пациентов гр.3 составила 51,5 пг/мл, что превосходило этот показатель гр. сравнения в 8 раз,  $p < 0,01$ . У пациентов гр.2 концентрация этого цитокина увеличена в 3,3 раза ( $p < 0,01$ ). Обнаружено достоверное повышение концентрации TNF в 2,4 раза в гр. 3 в сравнении с пациентами гр.2 ( $p < 0,01$ ).

Обнаружена сильная отрицательная корреляция между признаками ( $p < 0,05$ ): концентрацией в семенной жидкости IL-1 $\beta$  и подвижностью ( $R = -0,861$ ) и количеством сперматозоидов в эякуляте ( $R = -0,721$ ); концентрацией IL-18 и подвижностью ( $R = -0,807$ ); концентрацией TNF и подвижностью ( $R = -0,761$ ).

Повышение концентрации провоспалительных цитокинов в семенной жидкости связано с более низкой частотой наступления беременности. Следовательно, дисбаланс цитокинов в семенной жидкости может иметь прямой негативный эффект на сперматозоиды и их способность к оплодотворению. В работе А. Н. Al-Marzoqi et al. были получены сходные результаты при измерении концентрации цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18 и TNF в семенной жидкости бесплодных пациентов. Авторы так же отмечают значительную положительную корреляцию между уровнями TNF и IL-18 в семенной жидкости бесплодных пациентов [Al-Marzoqi, 2013]. Вероятно, это может указывать на то, что TNF стимулирует секрецию IL-18, что является примером каскадного действия цитокинов, обладающих синергетической биологической активностью. Полученные нами результаты согласуются с данным предположением.

### Анализ факторов врождённого иммунитета в эякуляте пациентов с варикоцеле

Нами был разработан комплексный подход для анализа компонентов ВИ в эякуляте мужчин, страдающих от варикоцеле, который включил оценку экспрессии генов распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4*, генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90*, являющихся их эндогенными лигандами и сигналами опасности DAMP, и концентрации в семенной жидкости эффекторных молекул ВИ - *HSP70*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *TNF*.

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Изменение показателей врождённого иммунитета в эякуляте пациентов с варикоцеле

Показатель	Группа	Гр. сравнения	Пациенты с варикоцеле
Экспрессия исследуемого гена в сперматозоидах, отн.ед.	<i>HSP60</i>	2,5 (1,5; 4,3)	6,7 (2,3; 12)*
	<i>HSP70</i>	2,8 (1,4; 4)	6 (2,7; 9)*
	<i>HSP90</i>	3,4 (0,6; 6,7)	10 (3,5; 16,5)*
	<i>TLR2</i>	1,2 (0,35; 3)	4,3 (2,7; 11)**
	<i>TLR4</i>	1,2 (0,3; 3)	15 (9; 23)***
Концентрация исследуемого цитокина в семенной жидкости, пг/мл	<i>HSP70</i>	224 (148; 268)	572 (420; 720)**
	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	1,1 (0,3; 3)	8,7 (6,3; 17)**
	<i>IL-18</i>	17,4 (8; 34,6)	142 (90; 231)**
	<i>TNF</i>	6,2 (5; 9,7)	41 (35,4; 48)***

Примечание: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  - достоверность различий при сравнении основной группы с контрольной группой.

В сравнении с группой здоровых доноров экспрессия гена *HSP60* среди пациентов с варикоцеле увеличена в 3 раза ( $p < 0,05$ ), гена *HSP70* – в 2 раза ( $p < 0,05$ ), и гена *HSP90* – в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ). Концентрация белка *HSP70* в семенной жидкости пациентов с варикоцеле была повышена в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ) относительно здоровых доноров. Корреляционный анализ повышения концентрации *HSP70* в семенной жидкости и снижения подвижности сперматозоидов выявил сильную степени связи  $R = -0,86$  ( $p < 0,05$ ).

Далее нами было продемонстрировано увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах мужчин с варикоцеле в 3,6 раз ( $p < 0,01$ ) и в 12,5 раза ( $p < 0,001$ ), соответственно, относительно здоровых доноров.

На следующем этапе было проведено измерение концентрации провоспалительных цитокинов *TNF*, *IL-1 $\beta$*  и *IL-18* в семенной жидкости, в ходе которого мы выявили увеличение

уровня IL-1 $\beta$  в 8 раз ( $p < 0,01$ ), TNF в 7 раз ( $p < 0,001$ ) и IL-18 в 8 раз ( $p < 0,01$ ) у пациентов с варикоцеле в сравнении с донорами здоровой группы.

Варикоцеле является наиболее распространенной патологией мужской репродуктивной системы, ведущей к бесплодию. Изучая механизмы ВИ в патогенезе бесплодия, вызванного варикоцеле, мы пришли к выводу, что при данной патологии ВИ играет неоднозначную роль. При варикоцеле наблюдается локальное повышение температуры, вызванное варикозным расширением вен семенных канатиков, и сперматозоиды оказываются в условиях гипертермии [Pastuszek A.W., 2015]. Продукция белков теплового шока HSP60, HSP70, HSP90 клеткой существенно возрастает при воздействии на неё факторов стресса, и тогда они выступают в роли эндогенных сигналов опасности DAMPs, активируя рецепторы TLR2 и TLR4 и запуская развитие стерильного воспаления и повышенную выработку провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 $\beta$  и IL-18, которые вносят существенный вклад в поддержание воспаления и нарушение фертильности сперматозоидов [Zeinali M., 2017; Ferlin A., 2010; Hassanpour H., 2017].

Таким образом, проведенное нами сравнительное комплексное исследование генов и кодируемых ими молекул ВИ при мужском бесплодии представляет собой новый подход к изучению механизмов нарушения фертильной функции, а также может быть использовано для разработки новых подходов диагностики и лечения бесплодия различного генеза.

## ВЫВОДЫ

1. У мужчин с идиопатическим бесплодием обнаружено достоверное снижение экспрессии генов  $\beta$ -дефензинов *HBD1* и *HBD126* в сперматозоидах и концентрации кодируемых ими пептидов в семенной жидкости, коррелирующее со степенью выраженности астенозооспермии.
2. Среди пациентов с ИДБ частота встречаемости мутантного генотипа *del/del* среди пациентов с бесплодием составила 18%, в то время как мужчин с генотипом *del/del* среди группы здоровых доноров выявлено не было. Увеличение частоты носительства мутантного аллеля *del* среди пациентов с бесплодием ассоциировано со снижением экспрессии гена *HBD126* в сперматозоидах, снижением концентрации HBD126 в семенной жидкости, с нарушением подвижности сперматозоидов, и, как следствие, с повышенным риском развития бесплодия.
3. В сперматозоидах пациентов с ИДБ с тяжелой степенью астенозооспермии продемонстрировано снижение экспрессии генов *HSP60* в 3,3 раза, *HSP70* в 5,6 раза и *HSP90* в 7 раз по сравнению с группой здоровых доноров. Одновременно с этим наблюдалось достоверное повышение концентрации белка HSP70 в семенной жидкости пациентов в сравнении со здоровыми донорами, что может быть объяснено нарушением экспрессии гена *HSP70* в сперматозоидах при одновременно повышенной продукцией HSP70 клетками эпидидимиса.
4. В сперматозоидах пациентов с ИДБ с тяжелой степенью астенозооспермии показана гиперэкспрессия генов рецепторов *TLR2* в 12 раз и *TLR4* в 8,7 раза в сравнении со здоровыми

мужчинами. Повышенная экспрессия генов мембранных рецепторов TLR2 и TLR4 была ассоциирована с нарушением подвижности ( $R=-560$ ,  $R=-501$ ,  $p<0,05$ , соответственно).

5. У пациентов с ИДБ обнаружено повышение концентрации цитокинов TNF, IL-1 $\beta$ , IL-18 в семенной жидкости. Высокая степень корреляции выявлена при оценке следующих признаков: концентрации в семенной жидкости IL-1 $\beta$  и подвижности сперматозоидов ( $R=-0,861$ ); концентрации IL-1 $\beta$  и количеством сперматозоидов ( $R=-0,721$ ); концентрации IL-18 и подвижности ( $R=-0,807$ ); концентрации TNF и подвижности сперматозоидов ( $R=-0,761$ ).

6. Выявлены иммунологически значимые маркеры, ассоциированные со снижением фертильного потенциала сперматозоидов при варикоцеле: увеличение в сперматозоидах экспрессии генов *HSP60* и *HSP90* более, чем в 3 раза, *TLR4* в 12,5 раза, увеличение в семенной жидкости концентрации цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 в 8 раз ( $p<0,05$ ) в сравнении со здоровыми донорами.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение носительства полиморфного аллеля rs11468374 гена *HBD126* позволяет обеспечить персонализированный подход в назначении оптимальной методики вспомогательных репродуктивных технологий. Так, обнаружение мутантного генотипа *del/del*, снижение экспрессии гена *HBD126* в сперматозоидах и концентрации белка HBD126 в семенной жидкости более, чем в 10 раз, в сочетании со снижением подвижности сперматозоидов ниже 15% может явиться достаточным основанием для назначения интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку.

2. Выявление мутантного генотипа *del/del HBD126*, сочетающегося со снижением выработки этого дефензина у мужчин с идиопатическим нарушением фертильной функции позволит диагностировать «астенозооспермию, обусловленную нарушением белковой структуры гликокаликса сперматозоидов».

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Патент на изобретение № 2759147**, Российская Федерация С12Q 1/68. «Способ оценки репродуктивной функции мужчин с идиопатическим бесплодием» / Ганковская Л.В., **Хасанова Е.М.**, Митюшина Н.Г., **опубл. 11.09.2021.**

2. **Хасанова Е.М.** Роль мутации гена противомикробного пептида DEFB126 в патогенезе мужского идиопатического бесплодия / Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская, В.В. Бурмакина // **Медицинская иммунология.** 2021. Т. 23, №5. С.1115-1124. [**Scopus**]

3. **Хасанова Е.М.** Значение пептидов семейства  $\beta$ -дефензинов в снижении мужской репродуктивной функции / Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская, В.В. Греченко, О.А. Свитич // **Иммунология.** 2021. Т. 42, №5. С. 470-479. [**Scopus, WoS**]

4. **Khasanova E.M.** The role of DEFB126 gene mutation in pathogenesis of idiopathic male

infertility / Gankovskaya L.V., Mityushina N.G., Khasanova E.M., Burmakina V.V., Svitich O.A.// European journal of allergy and clinical immunology. 2021. V. 76, P. 187

5. **Хасанова Е.М.** Исследование роли мутации гена противомикробного пептида DEFB126 в патогенезе идиопатического бесплодия у мужчин / Хасанова Е.М., Ганковская Л.В., Бурмакина В.В.// Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology., посвященной 300-летию РАН. 2021. С. 32.
6. **Хасанова Е.М.** Роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе мужского идиопатического бесплодия / Хасанова Е.М., Ганковская Л.В., Бурмакина В.В. // Сборник тезисов XXII Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и Дитя». 2021. С.142.
7. **Хасанова Е.М.** Гиперэкспрессия генов TLR2 и TLR4 и их лигандов в сперматозоидах мужчин с варикоцеле / Хасанова Е.М., Ганковская Л.В. // Сборник тезисов издания "Вестник аллерголога-иммунолога" в рамках Международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС 2021 (<https://allergovestnik.ru/giperekspressiya-genov-tlr2-i-tlr4-i-ih-ligand/>).
8. **Хасанова Е.М.** Неоднозначная роль факторов врождённого иммунитета в нарушении фертильной функции у мужчин при варикоцеле / Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская, В.В. Греченко // **Иммунология**. 2022. Т. 43, №1. С. 61-70. [Scopus, WoS]

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЗС – астенозооспермия

ВРТ – вспомогательная репродуктивная технология

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИДБ – идиопатическое бесплодие

DAMP (damage - associated molecular pattern) – молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью

HBD (human  $\beta$ -defensin) –  $\beta$ -дефензин человека

HSP (heat shock protein) – белок теплового шока

SNP (Single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидная замена

TLR (Toll-like receptors) - Toll-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли.