

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Хасанова Елена Минсалимовна

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Ганковская Людмила Викторовна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Роль иммунной системы в регуляции репродуктивной функции у мужчин	13
1.2 Значение иммунных механизмов в патогенезе мужского бесплодия.....	18
1.2.1 Аутоиммунное мужское бесплодие	18
1.2.2 Влияние цитокинов на фертильность сперматозоидов.....	22
1.2.3 Особенности механизмов врожденного иммунитета в формировании и нарушении мужской репродуктивной функции	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Клиническая характеристика исследуемых групп	43
2.2 Общая схема исследования	45
2.3 Получение и характеристика биологического материала.....	47
2.4. Выделение нуклеиновых кислот из сперматозоидов человека	51
2.5 Определение экспрессии генов <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>HSP60</i> , <i>HSP70</i> , <i>HSP90</i> , <i>DEFB1</i> , <i>DEFB126</i> методом ПЦР в режиме реального времени	54
2.5.1 Получение кДНК с помощью реакции обратной транскрипции	54
2.5.2 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	55
2.6 Определение носительства полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида <i>HBD126</i>	59
2.7 Определение содержания HBD1, HBD126, HSP70 в семенной плазме методом иммуноферментного анализа	61
2.8 Измерение концентрации цитокинов в семенной жидкости методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа	62
2.9 Статистическая обработка результатов	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	65
3.1 Анализ функциональных параметров сперматозоидов пациентов с бесплодием	66
3.2 Исследование показателей врождённого иммунитета в эякуляте	

пациентов с идиопатическим бесплодием.....	69
3.2.1 Снижение экспрессии генов <i>HBD1</i> и <i>HBD126</i> в сперматозоидах и концентрации кодируемых ими пептидов в семенной жидкости у пациентов с идиопатическим бесплодием.....	70
3.2.2 Анализ распределения полиморфного маркера rs11468374 гена <i>HBD126</i> у мужчин с идиопатическим бесплодием.....	75
3.2.3 Гиперэкспрессия генов <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием.....	81
3.2.4 Анализ экспрессии генов <i>HSP60</i> , <i>HSP70</i> , <i>HSP90</i> в сперматозоидах и концентрации <i>HSP70</i> в семенной жидкости мужчин с идиопатическим бесплодием.....	83
3.2.5 Измерение концентрации провоспалительных цитокинов в семенной плазме мужчин с идиопатическим бесплодием.....	88
3.3 Анализ факторов врождённого иммунитета в эякуляте пациентов с варикоцеле.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

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 [1, 2]. Кроме того, наблюдается тенденция к росту встречаемости «мужского» фактора бесплодия, выраженного в количественных и качественных нарушениях спермограммы. Частота встречаемости «мужского» фактора при обследовании пар на бесплодие приближается к 50%, что является критическим показателем для популяционной репродуктологии [3, 4].

Репродуктивная и иммунная системы находятся в тесной и динамичной взаимосвязи [5, 6]. 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: быстрое распознавание и эффективную элиминацию различных патогенных микроорганизмов, развитие и регуляцию воспаления, поддержание иммунопривилегированного статуса семенников, формирование структуры гликокаликса сперматозоидов и обеспечение их функциональной активности [7, 8]. Исследование иммунопатогенетических механизмов снижения мужской фертильной функции представляет собой важный аспект иммунологии репродукции.

Изучение факторов ВИ позволит значительно расширить понимание патогенетических механизмов идиопатического бесплодия (ИДБ), от которого страдает от 31 до 75% мужчин во всем мире [9]. 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 [10, 11, 12, 13, 14].

Кроме того, недавно было продемонстрировано, что вопреки общепринятой догме о том, что зрелые сперматозоиды представляют собой транскрипционно инертные клеточные элементы, их ядерные гены экспрессируются в виде белков митохондриальными рибосомами даже после созревания и эякуляции [15, 16]. Такой результат научных исследований открывает новые возможности и перспективы для изучения молекулярно-генетических механизмов нарушения фертильности зрелых сперматозоидов.

В процессы формирования и поддержания фертильности сперматозоидов вовлечены сотни генов, и носительство мутацией или полиморфных аллелей этих генов значительно сказывается на сперматогенезе, оплодотворении и функциональных характеристиках сперматозоидов. В ходе созревания до функционально зрелых форм в эпидидимисе половые клетки и их гликокаликс подвергаются значительным морфологическим и биохимическим изменениям. Одной из таких модификаций является появление в структуре гликокаликса сперматозоидов молекул противомикробных пептидов (ПМП) семейства β -дефензинов HBD1 и HBD126, которые участвуют в формировании функциональных свойств сперматозоидов и защищают их от патогенов и иммунных факторов в женском репродуктивном тракте [11]. Предполагается, что недостаточность их экспрессии и образование мутантной формы гликокаликса ассоциированы со снижением подвижности сперматозоидов и, соответственно, невозможностью оплодотворения [17, 18]. Однако на сегодняшний день отсутствует комплексное исследование роли β -дефензинов в патогенезе мужского идиопатического бесплодия и требуется расширение методов диагностики мужской репродуктивной дисфункции, включающее в себя определение мутантной формы гликокаликса сперматозоидов.

Другим перспективным направлением в исследовании нарушений репродуктивной функции мужчин является изучение дисбаланса факторов врожденного иммунитета в отсутствие инфекционно-воспалительного процесса, ведущего к нарушению фертильных свойств сперматозоидов напрямую. Примером такой патологии является варикоцеле, которое встречается у 35% мужчин с бесплодием [19, 20]. Патогенез данного заболевания считается мультифакториальным, и немаловажная роль в нём отводится активации врождённой иммунной системы и развитию стерильного воспаления, но детальные молекулярные механизмы нарушения сперматогенеза и функционирования сперматозоидов при варикоцеле остаются неясны.

Несмотря на интенсивное изучение этиологии и механизмов нарушения мужской фертильности и широкое внедрение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), остается актуальным поиск новых способов диагностики причин бесплодия 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 [21]. В настоящее время на основании экспериментальных и клинических исследований показано значимое влияние факторов врождённого иммунитета на формирование и поддержание в норме фертильных свойств сперматозоидов [10, 11, 14]. Однако на сегодняшний день

отсутствует целостное понимание того, как именно факторы врождённого иммунитета участвуют в патогенезе мужского бесплодия.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Провести комплексную оценку противомикробных пептидов β -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 β , 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 пациентов.

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 β* , *IL-18*, *TNF* и снижение выработки β -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.

Продemonстрировано комплексное повышение экспрессии генов *HSP70*, *HSP90*, *TLR4* и концентрации факторов врождённого иммунитета *HSP70*, *IL-18*, *TNF*, коррелирующее с нарушением функциональной активности сперматозоидов при варикоцеле, выраженное 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 β* , *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 β , IL-18 методом мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа.

Личный вклад

Автором были самостоятельно выполнены следующие этапы по подготовке диссертации: выбор направления исследования диссертационной работы, анализ и обобщение литературных источников, разработка дизайна исследования, определение целей и задач, транспортировка биоматериала, выделение ДНК/РНК, проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, проведение иммуноферментного и мультиплексного анализа, внесение получаемой информации в специально разработанные электронные таблицы и 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 β , 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, взаимодействиях с микробиомом и др.)» п.6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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, 2021 г.) конгрессе Европейской академии аллергии и клинической иммунологии EAACI Hybrid Congress 2021 (Madrid-Krakov, 2021 г.) конкурсе молодых ученых XXII Всероссийского научно-образовательного форума Мать и Дитя (Москва, 2021 г.) конкурсе молодых ученых в рамках Международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC 2021, (Москва, 2021 г.), Всероссийской научно-практической

студенческой конференции с международным участием «Медицинская весна-2021» (Москва, 2021г.).

Внедрение результатов в практику

Основные результаты работы используются в учебном и научном процессе на кафедре иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России 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 9 работ, из них 4 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.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 рисунками, приведено 12 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 184 библиографических источника, из них 12 отечественных и 172 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль иммунной системы в регуляции репродуктивной функции у мужчин

Регуляция мужской фертильной функции имеет многоуровневую организацию и зависит от скоординированной работы эндокринной, нервной и иммунной систем [8]. В процессе эволюции в тестикулах млекопитающих сформировалась уникальная толерогенная среда, защищающая высокоиммуногенные развивающиеся сперматозоиды от атаки со стороны иммунной системы. Вырабатываемые в семенниках половые гормоны влияют на развитие и функции иммунной системы, а её избыточная активация оказывает негативное влияние как на продукцию андрогенов, так и на развитие сперматозоидов, поэтому системный или местный воспалительный процесс ставит под угрозу мужскую фертильность.

Сперматогенез млекопитающих начинается со стадии недифференцированных сперматогоний, которые затем претерпевают редукционное деление, в конечном итоге образуя сперматозоиды. Наряду с морфологической трансформацией и сокращением набора генетического материала от диплоидного к гаплоидному значительно изменяются профили экспрессии генов и белков клеточной поверхности [22]. В ходе этого прогресса формируются антигены сперматозоидов, представляющие собой потенциальные мишени для иммунной системы. Это объясняется тем, что дифференцированные сперматозоиды образуются в организме в процессе полового созревания, спустя годы после установления и созревания иммунной системы, включая формирование толерантности к собственным антигенам. В результате белки, экспрессирующиеся исключительно на клеточной поверхности сперматозоидов, могут быть антигенными и иммуногенными для организма. Чтобы избежать аутоиммунной атаки на сперматозоиды и защитить сперматогенез, в яичках и семенниках был

сформирован ряд механизмов для создания безопасного и интактного окружения для этих клеток [23, 24].

Субпопуляции и свойства лейкоцитов, формирующих физиологически нормальное окружение семенников, принадлежат регуляторным и толерогенным типам, и именно они участвуют в создании уникальной иммунологической среды, необходимой для успешного протекания сперматогенеза. Сперматогенез — сложный процесс, в котором участвует множество факторов, включая клетки врождённой и адаптивной иммунной системы, цитокины, хемокины, белки теплового шока, а также неиммунные соматические клетки Сертоли (СК) и Лейдига (ЛК).

Поддержание статуса иммунной привилегированности и толерантности в семенниках достигается благодаря формированию гемато-тестикулярного барьера (ГТБ) и тонко отрегулированной системы взаимодействия клеток иммунной системы и соматических тестикулярных клеток. Механизмы формирования толерантности в семенниках включают в себя: сниженный воспалительный потенциал резидентных макрофагов; ингибирование продукции провоспалительных цитокинов; повышенную выработку регуляторных и толерогенных цитокинов, экспрессия которых индуцируется андрогенами; продукцию противовоспалительных цитокинов регуляторными иммунными клетками и соматическими клетками; антиген-специфическую иммунную супрессию дендритными клетками и тучными клетками. Все эти сложные молекулярно-клеточные механизмы подавления и регуляции иммунного ответа вместе с ГТБ образуют иммунологически привилегированную среду [5].

Соматические тестикулярные клетки Сертоли являются важной составляющей семенных канальцев и обеспечивают структурную и функциональную поддержку созревающим половым клеткам, формируя ГТБ. Этот барьер представляет собой физическую преграду для иммунных клеток и обеспечивает изолированную защитную среду развивающимся клеткам. Кроме того, СК продуцируют множество иммунорегуляторных факторов, среди которых толерогенные цитокины TGF- β и IL-10, галектин-1, индоламин-2,3-диоксигеназа,

ингибиторы гранзима В и системы комплемента [25, 26]. СК способствуют формированию противовоспалительной цитокиновой среды с повышенным количеством Treg и сниженным количеством CD4⁺ Т-клеток, что меняет профиль иммунного ответа с воспалительного на толерогенный [27]. Кроме того, было обнаружено, что СК также экспрессируют МНС-II и могут выступать в качестве непрофессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК), которые индуцируют превращение лимфоцитов из CD4⁺CD25⁻Т-клеток в CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-клетки [28]. Эти данные демонстрируют, что СК могут модифицировать функции и активность Т-лимфоцитов, продуцируя иммунорегуляторные факторы и посредством прямого взаимодействия с ними.

Клетки Лейдига представляют собой группу гормон-продуцирующих тестикулярных клеток млекопитающих, расположенных в интерстициальной области между семенными канальцами. Они выступают в роли первичного источника андрогенов, необходимых для успешного протекания сперматогенеза [29]. Показано, что ЛК могут связывать и удерживать на своей поверхности Т-лимфоциты, поскольку они экспрессируют молекулу адгезии VCAM-1, а совместное культивирование ЛК и Т-лимфоцитов продемонстрировало ингибирующее влияние ЛК на пролиферацию лимфоцитов [30, 31]. Кроме того, Т-лимфоциты широко экспрессируют рецепторы к андрогену, и таким образом, ЛК способны эндокринно модулировать их количество и функции [32]. Известно, что тестостерон напрямую ингибирует активацию CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, индуцирует продукцию ими IL-10 и способствует экспансии популяции Treg [33, 34, 35]. Таким образом, ЛК играют важную роль в защите сперматозоидов от аутоагрессии со стороны Т-лимфоцитов, а андрогены могут регулировать инфильтрацию и активность Т-клеток прямым и эндокринным путём.

Широко представленной популяцией клеток иммунной системы в мужском репродуктивном тракте являются лимфоциты. В семенниках млекопитающих были идентифицированы различные субпопуляции Т-лимфоцитов, в то время как В-лимфоциты в норме в этих тканях практически не определяются [36]. В семенниках млекопитающих были обнаружены различные субпопуляции Т-лимфоцитов:

регуляторные Т-лимфоциты (Treg), хелперные Т-клетки (Th1 и Th17), цитотоксические Т-клетки (Tc), натуральные киллерные Т-клетки (NKT) и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты [32].

В тестикулах наблюдается сильный количественный сдвиг в сторону CD8⁺ Т-лимфоцитов. Тс формируют важное звено адаптивной иммунной системы. Функция CD8⁺ Т-клеток заключается в уничтожении клеток, которые подверглись злокачественной трансформации, инфицированию внутриклеточными патогенами или повреждению [37]. Было показано, что процентное содержание CD8⁺ Т-лимфоцитов в 4 раза превышает процентное содержание CD4⁺-клеток [38]. Однако большинство тестикулярных CD8⁺-лимфоцитов представляют собой регуляторные, а не цитотоксические субпопуляции.

В семенниках млекопитающих были обнаружены субпопуляции хелперов Th1, Th2, Th17. Клетки Th1 в основном участвуют в противовирусном и антибактериальном иммунитете, продуцируя цитокины IFN- γ , IL-2 и TNF. Клетки Th2 играют важную роль в борьбе с внеклеточными паразитами и вырабатывают IL-4, IL5 и IL-13. Th17 необходимы для реализации противогрибковой и антибактериальной защиты, что достигается за счет секреции цитокинов IL-17A, IL-17F и IL-22. Субпопуляции Th2 и Th17 определяются в семенниках только при развитии воспаления [32].

Treg-клетки представляют собой группу регуляторных Т-лимфоцитов, которые обеспечивают функцию иммунологической толерантности на периферии. Они предотвращают развитие чрезмерного иммунного ответа и аутоиммунного процесса путем подавления активности других реактивных Т-клеток [37]. Механизмы супрессии Treg клеток включают в себя секрецию ингибирующих цитокинов IL-10, IL-35 и TGF- β , цитолиз активированных Т-лимфоцитов через Fas-опосредованный и цитокиновый механизмы, ингибирование ДК [39].

Treg лимфоциты были обнаружены в семенниках грызунов и человека [40, 41]. Известно, что Treg в основном определяются в дренирующих лимфатических узлах яичек, где постоянно взаимодействуют с тканеспецифическими аутоантигенами, что необходимо для поддержания их супрессорной функции [42].

Дефекты тестикулярных Treg приводят к развитию чрезмерного иммунного ответа и вызывают развитие аутоиммунного орхита. В частности, пациенты с мутацией гена аутоиммунного регулятора (AIRE), которая вызывает аутоиммунный полиэндокринный синдром-1, склонны к хроническому воспалению тестикул из-за дефицита Treg [43]. Следовательно, Treg имеют решающее значение для предотвращения органоспецифического аутоиммунного процесса в семенниках и поддержания их иммунопривилегированного состояния.

Среди многочисленных клеток врожденной иммунной защиты, представленных в мужском репродуктивном тракте и участвующих в формировании привилегированного статуса тестикул, наиболее распространенной популяций являются тестикулярные макрофаги (ТМ). Они были обнаружены в семенниках всех изученных видов млекопитающих [44]. Показано, что ТМ преимущественно имеют противовоспалительный фенотип, экспрессируют антигены МНС класса II, но демонстрируют сниженную способность к активации лимфоцитов *in vitro* ввиду сниженной или отсутствующей экспрессии основных ко-стимулирующих молекул В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86). Также они экспрессируют молекулу CD163 и продуцируют IL-10, и характеризуются сниженной продукцией iNOS, TNF и IL-1 β . В процессе полового развития макрофаги мигрируют в интерстициальную ткань яичек, становятся там резидентной популяцией и играют важную роль в нормальном развитии половых органов, способствуя пролиферации и созреванию ЛК [45, 46].

Молекулярное микроокружение тестикул содержит многочисленные иммунорегулирующие факторы, а именно тестостерон, простагландины, кортикостерон и активин-А, которые могут определять фенотип и функции ТМ, индуцируя экспрессию CD163 и IL-10 и снижая их способность к продукции TNF. Таким образом, эти клетки поляризованы в сторону иммунорегуляторной субпопуляции макрофагов М2 и участвуют в формировании иммунопривилегированного статуса тестикул [47, 48]. ТМ проявляют анергию к воспалительным стимулам, что необходимо для защиты развивающихся

сперматогенных клеток от повреждающего воздействия провоспалительных цитокинов [49].

Дендритные клетки определяются как «профессиональные» АПК и связующее звено между врождённым и адаптивным иммунитетом [37, 50]. Было показано, что в норме тестикулы крысы и паховые лимфатические узлы содержат CD103⁺ ДК, которые экспрессируют молекулы МНС II класса и ко-стимулирующие молекулы В7 [38]. Однако было показано, что тестикулярные ДК неспособны стимулировать пролиферацию наивных Т-лимфоцитов, поскольку, подобно тестикулярным макрофагам, в иммуносупрессорном микроокружении семенников приобретают регуляторный фенотип ДК2, и участвуют в поддержании иммунопривилегированного статуса [51].

1.2 Значение иммунных механизмов в патогенезе мужского бесплодия

Исходя из изложенного выше, молекулярно-клеточные механизмы и взаимодействия множества факторов иммунной системы формируют уникальную толерогенную среду в органах мужской репродукции, обеспечивающую процесс развития сперматозоидов и поддержание мужской фертильности. Однако в условиях развития патологического процесса, нарушения баланса между провоспалительными и толерогенными факторами и активации эффекторных механизмов адаптивной иммунной системы в этих тканях репродуктивная функция нарушается, и может развиться состояние бесплодия. Среди основных иммунных механизмов, участвующих в патогенезе мужского бесплодия, выделяют действие антиспермальных антител, эффекторные функции цитокинов и механизмы врожденного иммунитета.

1.2.1 Аутоиммунное мужское бесплодие

Долгое время считали, что нарушение мужской фертильной функции со стороны иммунной системы обусловлено эффекторными механизмами

адаптивного иммунитета и продукцией антиспермальных антител (АСАТ) [21]. Среди всех причин нарушения мужской фертильной функции на долю аутоиммунного бесплодия приходится около 12–20% случаев [52]. АСАТ представляют собой иммуноглобулины классов IgA, IgG и/или IgM, которые определяются в эякуляте и сыворотке бесплодных мужчин. Факторами риска, способными привести к их продукции, считают: нарушение целостности ГТБ, обструкцию семявыносящих протоков, хирургические вмешательства, простатит, орхит, рак яичек, инфекционные заболевания [53]. Вирусные и бактериальные инфекции, поражающие мужскую половую систему, считают наиболее распространенными факторами, ведущими к аутоиммунному бесплодию [54]. Часто даже после элиминации бактерий или при хроническом воспалении после перенесенной инфекции эпителий семенных пузырьков остаётся повреждённым, а сперматогенез претерпевает существенные нарушения вследствие того, что зародышевые клетки подвергаются апоптозу из-за избыточных провоспалительных стимулов [53].

Воспалительный процесс в семенниках (орхит) сопровождается нарушением целостности ГТБ, и мигрирующие лейкоциты образуют инфильтраты вокруг и внутри семенных канальцев и продуцируют провоспалительные медиаторы, что ведет к нарушению сперматогенеза и дальнейшему разрушению семенного эпителия [54]. Макрофаги M1 поглощают и разрушают развивающиеся сперматозоиды, и тем самым способствуют образованию DAMPs, которые будут выступать в роли аутоантигенов и активировать иммунную систему. Все эти процессы — индукция воспаления, нарушение целостности ГТБ, срыв тестикулярной толерантности и экспансия лейкоцитов — ведут к увеличению соотношения CD4/CD8 клеток, миграции и активации В-лимфоцитов и продукции АСАТ. АСАТ вызывают агглютинацию сперматозоидов, что снижает их способность к миграции и успешному взаимодействию с яйцеклеткой [54].

При развитии воспаления фертильность мужчины нарушается и на уровне сперматогенеза. Под воздействием провоспалительных стимулов эндотелиальные клетки семенников активируют экспрессию молекул адгезии гиалуронана и CD106,

а также выработку хемокинов, привлекающих в интерстициальное пространство лейкоциты [55]. Мигрировавшие лейкоциты в очаге воспаления секретируют провоспалительные и проапоптотические факторы, такие как TNF, IL-6 и FasL. TNF в основном продуцируется Th1-лимфоцитами и действует на рецептор TNFR1, экспрессируемый развивающимися зародышевыми клетками, вызывая их апоптоз [32]. Высокие уровни IL-6 в тестикулярном пространстве способствуют дальнейшему повреждению плотных контактов клеток Сертоли, высвобождению зародышевых клеток за ГТБ и их апоптозу [56, 57].

Нарушение гомеостаза в семенниках приводит к значительному изменению баланса в соотношении количества и функций различных субпопуляций Т-лимфоцитов. Так, в условиях активно развивающегося воспалительного процесса Тreg лимфоциты быстро исчерпывают свой супрессорный потенциал ввиду преобладания эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов и ингибирующего воздействия увеличивающихся концентраций провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 [40].

Наряду с Т-лимфоцитами ключевую роль в развитии орхита играют АПК - макрофаги и ДК. При аутоиммунном орхите количество ТМ и ДК значительно увеличивается при прогрессии заболевания. Фенотип макрофагов меняется с регуляторного М2 на провоспалительный М1, и они активно продуцируют медиаторы воспаления TNF, IL-6, MCP-1 и NO [54]. Анализ ДК из дренирующих лимфатических узлов яичка у крыс с аутоиммунным орхитом выявил, что они являются функционально зрелыми, презентуют антигены Т-клеткам, и стимулируют аутоиммунный ответ против сперматозоидов [58].

Особое внимание привлекает вопрос изучения влияния АСАТ на функциональные параметры сперматозоидов и патогенез олигоастенотератозооспермии. Олигоастенотератозооспермия (ОАТ-синдром) — это сложный комплекс изменений в качественных и количественных характеристиках эякулята, обуславливающих нарушение фертильной функции [59, 60]. Эякулят мужчин с тяжелым ОАТ-синдромом характеризуется уменьшением количества сперматозоидов, снижением уровня их подвижности и увеличением

числа сперматозоидов с мутантной морфологией. Была установлена корреляция между уровнями АСАТ в семенной плазме бесплодных мужчин и снижением фертильных свойств их сперматозоидов. Проведенный мета-анализ продемонстрировал, что присутствие АСАТ в семенной жидкости бесплодных пациентов коррелирует со снижением концентрации сперматозоидов и их подвижности по сравнению со здоровыми мужчинами [52]. В тоже время отрицательного влияния АСАТ на морфологию и жизнеспособность сперматозоидов в проведенных исследованиях подтверждено не было [61, 62]. Таким образом, развитие аутоиммунной реакции против антигенов сперматозоидов негативно сказывается на их подвижности вследствие агглютинации клеток, опсонизированных АСАТ, а также их общем количестве в эякуляте ввиду нарушения периферической толерантности, увеличения провоспалительных стимулов и запуска апоптоза.

Часто установить причину развития ОАТ-синдрома не удастся, и такие пациенты составляют группу мужчин с ИДБ [59]. На сегодняшний день проблема идиопатического мужского бесплодия считается критической для мирового здравоохранения, поскольку идентифицировать этиологический фактор, ведущий к снижению фертильной функции, не удастся в более чем 50% случаев. Предполагалось, что идиопатический ОАТ-синдром связан с чрезмерной активацией иммунной системы в отношении антигенов сперматозоидов и продукцией АСАТ [63]. Однако при детальном изучении роли АСАТ в патогенезе идиопатической олигоастенотератозооспермии было показано, что только единичные пациенты с идиопатическим ОАТ-синдромом имеют повышенные уровни АСАТ в эякуляте, в то время как у большинства пациентов не был индуцирован иммунный ответ против сперматозоидов [64].

Разнообразные повреждающие стимулы и инфекционные агенты, воздействующие на тестикулы, приводят к нарушению тонко отрегулированной системы взаимодействий между иммунными и неиммунными клетками. В результате формируется дисбаланс между толерогенными и провоспалительными факторами с критическим преобладанием последних, что неизбежно ведет к

нарушению сперматогенеза, выработке АСАТ и бесплодию, опосредованному клеточными механизмами адаптивного иммунитета. Однако механизмы нарушения мужской фертильной функции, скрывающиеся за диагнозом «идиопатическое бесплодие», требуют дальнейшего изучения.

1.2.2 Влияние цитокинов на фертильность сперматозоидов

Эякулят состоит из гетерогенной семенной жидкости и сперматозоидов. Семенная жидкость является средой, которая обеспечивает транспорт и выживание сперматозоидов, поскольку содержит множество биоактивных веществ, вырабатываемых клетками семенников, эпидидимиса и добавочных половых желез. Также в ней определяется множество факторов, относящихся к иммунной системе, среди которых простагландины, белки теплового шока, β -дефензины, факторы роста, хемокины и многочисленные цитокины и их растворимые рецепторы [65].

Цитокины представляют собой малые пептиды, формирующие самую многочисленную и универсальную в функциональном отношении группу гуморальных факторов иммунной системы [37]. С одной стороны, цитокины широко вовлечены в обеспечение сперматогенеза и репродуктивных процессов в нормальных физиологических условиях, и таким образом, являются конститутивными факторами, определяющимися в семенной жидкости [66]. С другой стороны, изменения продукции и экспрессии генов цитокинов и их рецепторов, а также носительство полиморфных аллелей генов ассоциированы с патогенезом многих заболеваний [67]. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов и/или снижение концентрации регуляторных в семенной жидкости связано с более низкой частотой наступления беременности. Следовательно, изменение баланса цитокинов может оказывать прямой негативный эффект на фертильный потенциал сперматозоидов. Хотя внимание ученых на протяжении многих лет привлекал вопрос изучения роли цитокинов в мужской репродукции, на текущий момент понимание их патофизиологической

роли и влияния на функции сперматозоидов остается спорным и не исследованным до конца. Показано, что эякулированные сперматозоиды способны вырабатывать биологически активные формы ряда цитокинов, которые действуют аутокринным и паракринным путем, влияя на функции сперматозоидов [68].

В эякуляте человека в норме определяются: интерлейкины (IL-1 α и -1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-23); молекулы семейства фактора некроза опухоли (TNF, TNF-related apoptosis-inducing ligand TRAIL); растворимые рецепторы и их антагонисты (IL1RA, sRIL-2, sRIL-6, TNF-R1, TNF-R2); гранулоцитарные и макрофагальные колониестимулирующие факторы (GM-CSF, G-CSF, M-CSF); интерфероны (IFN- γ); хемокины (IL-8); макрофагальные белки воспаления (MIP-1 α , MIP-1 β); трансформирующий фактор роста (TGF α , TGF β) и др. [66]. В тестикулах продукция цитокинов и других регуляторных факторов, контролирующих сперматогенез, осуществляется как соматическими ЛК и СК, так и многочисленными клетками иммунной системы.

Развитие аутоиммунного, инфекционного или стерильного воспалительного процесса в органах мужской репродуктивной системы ассоциировано со значительными биохимическими изменениями в составе семенной плазмы. При воспалении в эякуляте повышается количество лейкоцитов, вырабатывающих провоспалительные цитокины, которые негативно влияют на фертильный потенциал сперматозоидов. [69, 70, 71, 72].

Важным аспектом является изучение роли в репродуктивных процессах регуляторных цитокинов IL-10 и TGF- β . Физиологические функции TGF- β включают в себя регуляцию секреторной функции СК и ЛК, развития семенников и процесса сперматогенеза. Показано, что в высокой концентрации TGF- β совместно с TNF участвует в активации апоптоза половых клеток [73, 74]. IL-10 обладает способностью ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов лейкоцитами и обеспечивать толерогенный эффект на периферии. Содержание IL-10 в семенной жидкости считают показателем мужской репродуктивной функции,

поскольку повышение или снижение его концентрации отражают состояние местного иммунитета и негативно сказывается на фертильности [75, 76].

Не менее важным вопросом является изменение цитокинового профиля в эякуляте мужчин с варикоцеле. Патогенез данного заболевания считается мультифакториальным, поскольку помимо варикозного расширения вен гроздевидного сплетения, локальной гипертермии и последующего оксидативного стресса большая роль отводится активации врождённой иммунной системы и развитию стерильного воспаления. В условиях локального повышения температуры в семенниках и клеточного стресса активируются механизмы врождённой иммунной защиты, в частности, паттерн-распознающие рецепторы TLR2 и TLR4, активация которых индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов [20]. Несмотря на значительную распространенность данной патологии, детальные патогенетические механизмы нарушения сперматогенеза и функционирования сперматозоидов остаются неясны. Некоторые ученые предполагают, что в патогенезе бесплодия при варикоцеле значимая роль в нарушении фертильных свойств сперматозоидов отводится именно цитокинам, определяемым в семенной плазме [66, 68, 77, 78, 79]. Учитывая, что IL-1 способен ауто- и паракринно регулировать развитие и жизненные функции сперматозоидов, было предположено, что избыточная экспрессия этого цитокина может играть критическую роль для фертильного потенциала сперматозоидов мужчин с варикоцеле [68]. Другим потенциальным звеном патогенеза нарушения фертильной функции при варикоцеле предполагается действие проапоптотического TNF, однако данные о влиянии этого цитокина на сперматозоиды на сегодняшний день противоречивы.

1.2.3 Особенности механизмов врождённого иммунитета в формировании и нарушении мужской репродуктивной функции

Семенники представляют собой иммунопривилегированный орган, где потенциал развития системного иммунного ответа значительно снижен и

находится под контролем множества факторов. Однако несмотря на это, микробные патогены, проникающие в мужском репродуктивном тракте с током циркулирующей крови или через восходящие мочеполовые пути, эффективно элиминируются. Это достигается за счет усиленной реакции механизмов местной врождённой иммунной защиты. Арсенал факторов ВИ в мужском репродуктивном тракте довольно широк и включает экспрессию различных паттерн-распознающих рецепторов (PRR, pattern-recognition receptors), усиленную выработку провоспалительных цитокинов при вторжении инфекционных агентов, продукцию специфических противомикробных пептидов семейства β -дефензинов и многое другое [80].

Ранее было принято считать, что сперматозоиды представляют собой транскрипционно и трансляционно инертные клеточные элементы. Согласно новым данным и последним исследованиям, эякулированные сперматозоиды способны осуществлять синтез белков на финальной стадии созревания и после эякуляции с использованием митохондриальных рибосом [6]. Таким образом, вопреки общепринятой догме, ядерные гены в сперматозоидах экспрессируются и транслируются в белки даже во время пребывания в женских половых путях [5].

Роль белков семейства β -дефензинов в патогенезе мужского бесплодия

Во время созревания в придатке яичка сперматозоиды млекопитающих подвергаются морфологическим, физиологическим и биохимическим пост-трансляционным изменениям, которые считаются этапом их нормального развития до функционально зрелых клеточных форм. Структурным и биохимическим модификациям подвергается в том числе и гликокаликс плазматической мембраны сперматозоидов, в результате чего эти клетки становятся подвижными и способными к оплодотворению яйцеклетки [81]. Подвижность сперматозоидов является ключевой характеристикой их фертильности, и во многом она определяется именно структурой и свойствами гликокаликса [82]. В норме зрелые сперматозоиды млекопитающих покрыты толстым слоем отрицательно

заряженного гликокаликса, содержащего множество различных гликопротеинов и гликолипидов. От полноценной структуры гликокаликса зависит способность сперматозоидов к миграции и капцитации, локальная защита от инфекционных агентов и АСАТ, и взаимодействие сперматозоида с яйцеклеткой. Одними из важнейших компонентов структуры гликокаликса сперматозоидов являются противомикробные пептиды (ПМП) семейства β -дефензинов [17].

ПМП включают в себя гетерогенную группу молекул, представляющих первую линию защиты организма от патогенов. Это небольшие, состоящие из 12-50 аминокислотных остатков, молекулы с различными физико-химическими свойствами и структурой. Описано 3 подсемейства дефензинов: α -, β - и θ -дефензины. Присутствие α -дефензинов было обнаружено в мужских половых путях и, в значительной степени, в нейтрофильных гранулах и клетках Панета тонкого кишечника. ПМП семейства β -дефензинов представляют собой группу важных гуморальных компонентов системы ВИ и широко экспрессируются эпителиальными клетками слизистых оболочек респираторного и гастроинтестинального трактов, кожи, рта, глаза, женского и мужского уrogenитальных трактов, а также сперматозоидами [83]. Спектр функций ПМП охватывает такие процессы, как обеспечение прямой противомикробной активности в отношении широкого спектра чужеродных микроорганизмов, влияние на хемотаксис, стимуляцию пролиферации клеток и выработки ими цитокинов, а также участие в процессах репродукции [84]. В мужском репродуктивном тракте экспрессия β -дефензинов обнаружена в простате, семенниках, а также в плазматической мембране сперматозоидов, где они осуществляют функцию местной защиты от инфекций, АСАТ и активных форм кислорода (АФК), формируя своеобразный щит вокруг мужских половых клеток [11, 85]. Однако белки этого семейства выполняют не только функцию локальной иммунной защиты сперматозоидов. Особый интерес представляет собой исследование роли ПМП семейства β -дефензинов в формировании функциональной активности и фертильности сперматозоидов [86]. Было показано, что несколько молекул семейства β -дефензинов (DEFB118, DEFB125–127), гены

которых картированы на коротком плече 20 хромосомы, специфически и на высоком уровне экспрессируются в эпидидимисе и мужскими половыми клетками, однако их роли и функции остаются не до конца изученными [87, 88, 89].

Противомикробный пептид HBD1 (Human β -defensin 1) активно вырабатывается эпителиальными клетками слизистых оболочек. Его ген *DEFB1* конститутивно экспрессируется, что обеспечивает эффективную и быструю защиту как от внешних, так и внутренних угроз. Показано, что экспрессия гена *DEFB1* регулируется воспалительными медиаторами, изменением концентрации глюкозы, воздействием ультрафиолета, и многими другими факторами [90, 91, 92, 93]. Подтверждена роль *DEFB1* как гена-супрессора опухолевого процесса, а его высокая экспрессия ассоциирована с более благоприятным прогнозом при некоторых онкологических заболеваниях [94, 95].

Известно, что сперматозоиды на всех стадиях развития, от сперматоцитов первого порядка до поздних сперматид, экспрессируют HBD1. Также этот β -дефензин присутствует в семенной жидкости и на поверхности эякулированных сперматозоидов [85]. Предполагается, что дефицит HBD1 ассоциирован с недостаточностью мужской фертильной функции, так как HBD1 обладает способностью регулировать CCR6-зависимую мобилизацию ионов кальция Ca^{++} , что увеличивает подвижность сперматозоидов и их способность проникать в яйцеклетку. Было показано, что рецептор CCR6 (C-C chemokine receptor type 6) экспрессируется на поверхности сперматозоидов, и играет существенную роль в различных критически важных для мужской репродукции физиологических процессах, например, регуляции хемотаксиса сперматозоидов, их подвижности и антимикробной защиты [96, 97]. Опыты инкубации сперматозоидов с рекомбинантными β -дефензинами имели положительные результаты и демонстрировали поддержание их жизнеспособности и подвижности [98, 99, 100, 101].

Другим принципиально важным ПМП, входящим в структуру гликокаликса сперматозоидов, является β -дефензин HBD126 (DEFB126). Ген *DEFB126* человека расположен на субтеломерном конце хромосомы 20p13. HBD126 входит в

структуру гликокаликса сперматозоидов млекопитающих и представляет собой гомодимер, связанный с мембраной гидрофобными аминокислотными остатками, с молекулярной массой 13 кДа и длиной 111 аминокислот. HBD126 состоит из типичного для этого семейства молекул богатого цистеином β -дефензинового остова и специфичного высоко гликозилированного длинного пептидного конца. Карбоксильный конец протеина имеет порядка 20 сайтов O-гликозилирования и содержит гликаны, богатые сиаловыми кислотами [17]. Как член семейства β -дефензинов, DEFB126 демонстрирует противомикробную активность *in vitro* и способность связывать липополисахариды [102, 103, 104, 105].

Белок DEFB126 определяется на поверхности эякулированных сперматозоидов. Появление на поверхности сперматозоидов этого белка происходит в результате пост-трансляционной модификации, в ходе которой он синтезируется *de novo* в аппарате Гольджи, после чего мигрирует в составе секреторных везикул к клеточной поверхности и встраивается в мембрану [17]. Данные иммунофлюоресцентного анализа и электронной микроскопии показывают, что этот дефензин равномерно распределен по всей клеточной поверхности сперматозоида и прочно с ней связан [106].

Проведены единичные исследования, показавшие, что спектр функций DEFB126 охватывает такие процессы, как обеспечение эффективного продвижения сперматозоида в женском половом тракте, защиту от патогенов и ферментативного расщепления, препятствие распознаванию сперматозоидов компонентами женской иммунной системы, капацитацию и успешное оплодотворение яйцеклетки [17, 81, 86].

Среди олигосахаридов, входящих в состав β -дефензина 126, по-видимому, решающее значение для миграции сперматозоидов имеют именно сиаловые кислоты, так как они формируют отрицательный заряд клеточной поверхности. Удаление терминальных остатков сиаловых кислот из структуры молекулы белка путем обработки клеточной суспензии сиалидазой или нейрамнидазой ведет к уменьшению количества сперматозоидов, успешно преодолевающих барьер цервикальной слизи. Предполагается, что отрицательный заряд клеточной

поверхности позволяет сперматозоидам скользить с минимальным сопротивлением за счет взаимного отталкивания от отрицательно заряженных клеток мукуса [105, 107].

Другая, не менее важная функция молекул DEFB126, заключается в сокрытии антигенов сперматозоидов от факторов иммунной системы женского репродуктивного тракта [17]. Сперматозоиды облагают большой иммуногенностью, так как содержат множество белков, неспецифичных для организма женщины. По всей видимости, белок DEFB126 защищает мужские антигены от фагоцитов, компонентов комплимента, а также антител организма женщины [82, 102, 106]. Показано также, что кролики, иммунизированные против цельной спермы, вырабатывают антитела в основном к молекулам DEFB126, а при удалении дефензина или его сиаловых кислот до иммунизации наблюдается развитие более сильного иммунного ответа и выработка антител против спектра спермальных антигенов, а не только против DEFB126 [105]. Таким образом, дефензиновый покров сперматозоидов и сиаловые кислоты в его составе выполняют иммунопротективную функцию в женском репродуктивном тракте.

По мере продвижения сперматозоидов по женскому репродуктивному тракту до маточных труб, где в норме происходит оплодотворение, белок DEFB126 не утрачивает своего важного значения для фертильности. Во время восходящего движения по женскому половому тракту лишь небольшая часть сперматозоидов успешно мигрирует в фаллопиевы трубы, где молекулы гликокаликса образуют связи с мембранными молекулами эпителиальных клеток, формируя своеобразный резервуар, в котором пребывают до наступления овуляции [108]. В такой форме они сохраняют способность к оплодотворению до нескольких дней и с меньшей вероятностью подвержены спонтанному сбросу защитного гликокаликсного слоя со своей поверхности. С наступлением овуляции яйцеводная жидкость претерпевает значительные изменения — меняется ее pH, ионный состав, вырабатываются перiovуляторные гормоны. Эти изменения индуцируют капацитацию сперматозоидов — гликокаликс их клеточной поверхности разрушается, они покидают свои резервуары, отделяются от эпителия и плывут по

маточной трубе навстречу яйцеклетке [109]. Показано, что удаление с поверхности клеток молекул DEFB126, добавление антител к ним или обработка сиалидазой ингибирует способность сперматозоидов связываться с эпителиальными клетками яйцевода *in vitro* и формировать резервуар до наступления овуляции [17, 105]. Таким образом, β -дефензин 126 обеспечивает выживаемость и сохранность ресурсов сперматозоидов до встречи с яйцеклеткой.

В последние годы было продемонстрировано, что идентифицированный в структуре гена β -дефензина человека *DEFB126* полиморфизм (rs11468374), представляющий собой двунуклеотидную делецию во втором экзоне (2-nt *del/del*) (NCBI database, accession AK22598), вовлечен в патогенез снижения мужской фертильной функции [17, 86, 106, 109, 110]. Предполагается, что данная мутация гена *DEFB126* ассоциирована со значительным изменением структуры гликокаликса и снижением количества О-гликанов в структуре его молекул и встречается среди мужчин разных популяций, опосредуя нарушения их фертильной функции (рисунок 1).

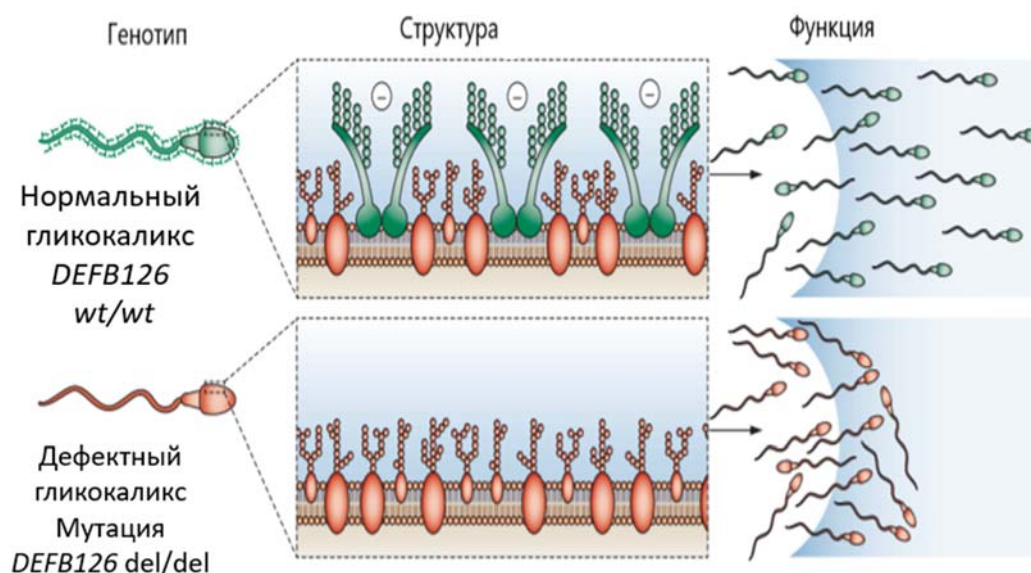


Рисунок 1 – Влияние носительства мутации гена *DEFB126* на структуру гликокаликса сперматозоидов и их способность к миграции (адаптировано из Tollner, T. L. et al., 2012) [17]

Было показано, что в результате носительства этой мутации происходит сдвиг рамки считывания, и образуется непрерывная мРНК, лишенная стоп-кодона [17, 106]. При подобных мутациях аномальная мРНК связывает рибосому, которая осуществляет их трансляцию, до тех пор, пока не дойдет до поли(А)-хвоста, на котором останавливается, поскольку не может диссоциировать от мРНК [111, 112]. Будучи связанными с дефектными транскриптами, рибосомы не в состоянии осуществлять синтез нормальных белков [113, 114]. Такие мРНК фактически лишены своего функционального значения и должны быстро подвергаться непрерывной деградации (nonstop RNA decay) — внутриклеточному механизму контроля качества образующихся мРНК [115]. При исследовании других генов, несущих мутации, при которых отсутствует стоп-кодон внутри рамки считывания, было показано, что экспрессия мРНК мутантного гена достоверно снижена в сравнении с уровнем соответствующей мРНК дикого типа [116, 117]. Сперматозоиды мужчин-носителей данной мутации не имеют морфологических изменений, но оказываются неспособными к продвижению сквозь слой гиалуронового геля, который имитирует цервикальный мукус [118, 119].

Предполагается, что нарушение функции белков семейства β -дефензинов негативно сказывается на оплодотворяющей способности сперматозоидов на разных уровнях: ухудшается их способность к миграции сквозь слой цервикальной слизи, понижается уровень подвижности, снижается способность связываться с эпителием верхних отделов женского репродуктивного тракта, а также повышается подверженность инфекциям репродуктивного тракта в виду местной защитной функции дефензинов.

Влияние активации Toll-подобных рецепторов на фертильные свойства сперматозоидов

Исследования показали, что множество рецепторов ВИ широко экспрессируется клетками семенников и сперматозоидами [120]. PRR-инициированный иммунный ответ чрезвычайно важен для сохранности мужской

репродукции, поскольку он должен обладать достаточной силой, чтобы преодолеть иммунную привилегию и вызвать соответствующий локальный иммунный ответ против инвазии патогенов [5]. PRR представляют собой надсемейство рецепторов, которые активируются при распознавании консервативных молекулярных структур эндогенного или экзогенного происхождения, называемых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) или ассоциированными с повреждением молекулярными паттернами (DAMP), соответственно [120, 121].

Было идентифицировано и охарактеризовано несколько подсемейств рецепторов PRR [122]. Самый большой и наиболее изученный класс паттерн-распознающих рецепторов — это Toll-подобные рецепторы, которые являются членами более крупного семейства белков, включающего рецептор интерлейкина IL-1 (IL1R), и имеют общий консервативный цитоплазматический домен Toll/IL1R, называемый TIR. Рецепторы этого семейства относятся к группе трансмембранных гликопротеинов с высоко консервативной структурой [37]. Было идентифицировано 10 функциональных человеческих TLR (TLR1–10). По локализации выделяют TLR, экспрессированные на клеточной поверхности, которые распознают бактериальные белки, липопротеины и липополисахариды, и внутрицитоплазматические эндосомальные TLR, которые распознают одноцепочечные и двухцепочечные РНК вирусов и CpG-содержащую ДНК бактерий. Спектр распознаваемых лигандов для TLR включает в себя и эндогенные сигналы опасности, такие как белки теплового шока, β -дефензины, ауто-РНК и ауто-ДНК, фибронектин, кристаллы амилоида и др. Хотя принято считать, что TLR в большей степени экспрессируются клетками миелоидной линии, эти рецепторы также обнаружены на Т- и В-лимфоцитах, эпителиальных клетках, на клетках мужского и женского уrogenитального тракта, СК, ЛК и сперматозоидах [10, 123, 124].

Другими важными распознающими рецепторами ВИ, представленными в клетках мужской репродуктивной системы, являются семейство NOD-подобных рецепторов, (Nod или NLR), и семейство рецепторов, подобных гену, индуцируемому ретиноевой кислотой (RIG, RLR) [124]. У человека

охарактеризовано более 20 членов NLR, распознающих широкий спектр цитозольных PAMPs и DAMPs. NLR выполняют различные функции в защите от патогенов. Некоторые из этих рецепторов, например, Nod1 и Nod2, активируют транскрипционный фактор NF- κ B и MAP киназы, что индуцирует синтез провоспалительных цитокинов. Другие рецепторы семейства NLR выступают в качестве активаторов инфламмосомных комплексов, которые индуцируют активность цистеиновой протеазы — каспазы 1, которая процессирует молекулы про-IL-1 β и про-IL-18 до их биологически активных форм, или инициируют гибель клетки путем пироптоза [125]. Экспрессия рецепторов NOD1 и NOD2 была зафиксирована в некоторых тестикулярных клетках, включая СК и сперматогонии [126]. Специфическим для мужского репродуктивного тракта является рецептор NLRP14, который выполняет роль основного регулятора дифференцировки первичных зародышевых клеток *in vitro*. Физиологически нокаут гена *Nlrp14* приводит к нарушению репродуктивной функции у самцов мышей [127]. Нарушения функционирования или формирования комплекса NLRP14 или наличие мутаций в гене *Nlrp14* являются причинами развития фертильной дисфункции, однако ввиду отсутствия соответствующих диагностических методов мужчины с этими нарушениями составляют группу с идиопатическим бесплодием.

TLR представляют собой наиболее хорошо охарактеризованное семейство паттерн-распознающих рецепторов, экспрессируемых клетками мужского репродуктивного тракта [124, 128]. Известно, что зародышевые клетки на разных стадиях развития экспрессируют рецепторы TLR [5]. Было показано, что у самцов мышей определяются рецепторы TLR3 в сперматогониях и сперматоцитах и TLR11 в сперматиде [129, 130]. Зрелые сперматозоиды человека, находящиеся в придатках яичек, экспрессируют на своей поверхности TLR1, TLR5, TLR8, TLR9 и TLR11. И эпидидимальные, и развивающиеся тестикулярные сперматозоиды экспрессируют рецепторы TLR2, TLR3, TLR4 и TLR7 [131]. Обилие обнаруженных TLR на мембранах сперматозоидов позволяет предположить, что они вносят существенный вклад в формирование локальной защиты этих клеток, однако

интересным аспектом явилось изучение влияния активации этих рецепторов на фертильные свойства сперматозоидов.

Связывание рецептора TLR с его лигандом индуцирует димеризацию рецептора и конформационные изменения, необходимые для связывания адаптерных молекул с TIR доменом. Дальнейшая передача сигналов происходит при участии важнейших адаптерных протеинов, в частности белка первичного ответа миелоидной дифференцировки 88 (MyD88), адаптерного белка, содержащего домен TIR, индуцирующего интерферон (TRIF, TIR domain-containing adapter molecule 1), и родственной TRIF адаптерной молекулы (TRIF-related adapter molecule). Была идентифицирована дополнительная адаптерная молекула, представляющая собой стерильный белок SARM (Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein), функция которого заключается в негативной регуляции передачи сигналов от TLR [132]. В зависимости от распознаваемого лиганда активируется один из двух сигнальных каскадов TLR, которые классифицируются как MyD88-зависимый сигнальный путь и MyD88-независимый сигнальный путь [120].

Индукция MyD88-зависимого пути активирует сигнальный каскад, который в конечном итоге опосредует убиквитинирование и деградацию регуляторного протеина I κ B- α , ингибирующего активность димера транскрипционного ядерного фактора NF- κ B (nuclear factor kappa B). Впоследствии NF- κ B транслоцируется в ядро и активирует экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF. Кроме того, в результате активации MyD88-зависимого пути в каскад вовлекаются N-концевая киназа Jun (Jnk) и киназа митоген-активируемого белка (MAP) p38, активирующие транскрипционный фактор AP-1 (activating protein-1, активирующий белок-1), также играющий важную роль в процессах воспаления, пролиферации и клеточной гибели [37, 120].

Активация MyD88-независимого сигнального пути в свою очередь опосредована взаимодействием адаптерных молекул TRIF и TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3), связывающей киназу 1 (TBK1). Активированная киназа TBK1 совместно с индуцируемой киназой IKK ϵ фосфорилируют интерферон-

регулирующий фактор 3 (IRF3, Interferon regulatory factor 3). Фосфорилированные молекулы IRF3 образуют гомодимеры, которые транслоцируются в ядро, что приводит к экспрессии ряда IFN-индуцируемых генов, таких как IFN α/β , IP10 и RANTES [8].

Однако пути активации TLR и ее конечный результат в сперматозоидах имеет свои специфические особенности (рисунок 2).

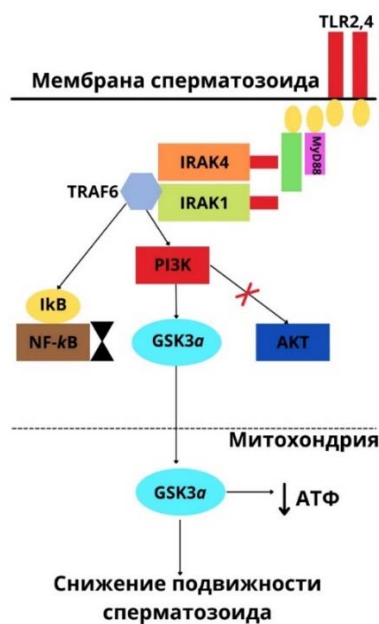


Рисунок 2 – Сигнальный путь активации мембранных рецепторов сперматозоидов TLR2 и TLR4

Развитие инфекционного воспаления в мужских половых органах сопровождается снижением подвижности сперматозоидов, что, соответственно, негативно сказывается на их способности к оплодотворению [133]. Подвижность является важной функциональной характеристикой зрелых сперматозоидов и зависит от множества внутренних и внешних факторов, таких как pH окружающей среды, температура, уровень внутриклеточного кальция и уровень циклического АМФ [134]. В большинстве клеток митохондрии обеспечивают большую часть энергии, необходимой для клеточной активности. Следовательно, биохимические сигналы, влияющие на функцию митохондрий, могут приводить к изменениям подвижности клеток.

Снижению подвижности сперматозоидов может способствовать активность протеинкиназ. Было показано, что при действии на сперматозоиды человека и мыши агонистами TLR2 и TLR4 наблюдается снижение мембранного потенциала митохондрий и уровня АТФ в клетках в результате активации MyD88-PI3K-GSK3 α -зависимого пути, и такие сперматозоиды демонстрируют значительное снижение уровня подвижности [135]. Фосфатидилинозитол-3-киназа PI3K представляет собой фермент, который катализирует фосфорилирование мембранных липидов и участвует во многих биологических процессах, включая рост, дифференцировку, выживание и подвижность клеток [136]. Обработка сперматозоидов агонистами TLR стимулирует активность PI3K, а блокада передачи сигналов от PI3K с помощью ингибиторов или методов нокаута гена восстанавливает вызванное агонистами TLR снижение подвижности сперматозоидов, что предполагает, что активация PI3K играет существенную роль в этом процессе [135]. Киназа гликогенсинтазы GSK3 представляет собой серин-треониновую протеинкиназу, которая фосфорилирует и инактивирует гликогенсинтазу. Ее изоформа α участвует в контроле активности гликогенсинтазы и некоторых факторов транскрипции, а изоформа β является конститутивным митохондриальным белком и мишенью фосфорилирования киназы АКТ [137]. GSK3 β и АТФ-синтаза участвуют в передаче сигналов PI3K [138]. Интересно, что действие ЛПС вызывает увеличение количества изоформы GSK3 α , но не GSK3 β в сперматозоидах, следовательно, GSK3 α может также активироваться после активации PI3K. Нарушение подвижности сперматозоидов и снижение уровня АТФ были отмечены у мышей с нокаутом гена GSK3 α , что указывает на связь между GSK3 α и митохондриальным метаболизмом [139]. Было показано, что ингибирование передачи сигналов от GSK3 α обращало вспять снижение подвижности сперматозоидов, вызванного активацией TLR.

Роль белков теплового шока в нарушении мужской репродуктивной функции

Белки теплового шока (БТШ, heat shock proteins, HSP) составляют обширное семейство функционально схожих высококонсервативных молекул, которые широко экспрессируются разными популяциями клеток [140]. Гены белков теплового шока закодированы в локусе МНС класса III, картированном в коротком плече шестой хромосомы человека (6p21.3). Данный класс белков принимает участие в обеспечении широкого спектра гомеостатических процессов: они выступают в роли клеточных шаперонов и предотвращают неправильную сборку и агрегацию формирующихся полипептидов, участвуют в контроле клеточного цикла и апоптоза, сопровождают антигенные пептиды в ходе процессинга и презентации, регулируют сперматогенез [141].

Экспрессия БТШ значительно возрастает при воздействии на клетку стрессовых факторов, таких как гипертермия, гипоксия, свободные радикалы, инфекции, при злокачественной трансформации, колебаниях концентрации глюкозы, действии УФ- и гамма-облучения, приеме цитостатических препаратов [142]. Хотя все БТШ образуются внутриклеточно, после синтеза БТШ60, 70 и 90 могут транспортироваться на плазматическую мембрану клетки и затем высвободиться во внеклеточное пространство [143]. В условиях клеточного стресса БТШ выступают в роли эндогенных сигналов опасности DAMP's и активируют рецепторы семейства TLR согласно модели «опасность/повреждение» [142]. Таким образом, при развитии воспалительного процесса БТШ участвуют в активации АПК и лимфоцитов, и тем самым обеспечивают взаимосвязь между врождённым и адаптивным звеньями иммунной системы [144].

Согласно современным классификациям, БТШ разделяют либо по молекулярной массе, выраженной в кДа, либо по выполняемым в клетке функциям. Выделяют малые семейства БТШ (small HSP) с молекулярной массой 25/27 кДа, 22 и 20 кДа и высокомолекулярные семейства БТШ110, 100, 90, 70, 60, 40. Каждый из охарактеризованных БТШ выполняет специфические функции в поддержании гомеостаза организма. В геноме человека представлено по несколько генов внутри

каждого семейства белков теплового шока, и такая избыточность может быть связана либо с различиями в локализации в разных клеточных компартментах, либо с характерными тканеспецифическими паттернами экспрессии. Белки, входящие в одно семейство БТШ, характеризуются высоким уровнем гомологии среди почти всех видов живых организмов. БТШ встречаются практически во всех клеточных компартментах, где они выполняют широкий спектр функций [145].

По характеру синтеза БТШ подразделяют на конститутивные, постоянно синтезирующиеся в клетке, и индуцибельные, синтез которых зависит от воздействия на клетки повреждающего фактора. Индуцированное стрессом повышение уровня экспрессии БТШ предположительно должно «корректировать» метаболические отклонения и предотвратить летальные повреждения клетки, вызванные агрегацией и мисфолдингом белков, при этом синтез других белков в клетке подавляется. Кроме того, значительное увеличение количества БТШ в цитозоле наблюдается во время репликации, пролиферации и дифференцировки [146].

Множество исследований подтверждают участие белков этого семейства в аутоиммунных процессах, формировании противоопухолевого и воспалительного иммунного ответа, патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [142, 144]. Однако в последние годы особый интерес представляет собой изучение влияния различных БТШ на процессы репродукции и патогенез мужского бесплодия при варикоцеле в условиях стерильного воспаления и при нарушении мужской репродуктивной функции невыясненного генеза. Наиболее важными в процессах сперматогенеза и репродукции были определены белки семейств БТШ60, БТШ70 и БТШ90.

Процесс сперматогенеза включает в себя ряд последовательных событий, включающих митоз, мейоз, дифференцировку и созревание сперматозоидов. Сначала клетки-сперматогонии проходят через несколько циклов митоза, в результате чего их количество экспоненциально увеличивается. После пролиферации и дифференцировки сперматогонии делятся и образуют первичные сперматоциты. Далее клетки подвергаются мейотическому делению, во время

которого генетический материал подвергается рекомбинации и делится вдвое, в результате чего образуются гаплоидные сперматиды. Процесс созревания сперматид в сперматозоиды носит название спермиогенез, и он включает основные морфологические преобразования, такие как формирование жгутика и акросомы и конденсацию хромосом. Уникальные особенности каждого этапа развития и дифференцировки зародышевых клеток диктуются паттернами экспрессии белков, характерными для каждого типа клеток. Экспрессия различных БТШ определяется как строго регулируемое событие на протяжении всего процесса сперматогенеза, необходимое для обеспечения специализированных потребностей дифференцирующихся клеток. Предполагается, что специфичные для клеток семенников паттерны экспрессии некоторых членов семейств БТШ60, БТШ70 и БТШ90 являются конститутивными, другие призваны выполнять функцию молекулярных шаперонов на определенных этапах дифференцировки, а экспрессия третьих индуцируется воздействием неблагоприятных факторов [146].

Наиболее хорошо изученным, распространенным и консервативным семейством БТШ является группа белков БТШ70, экспрессия которых демонстрирует и конститутивный характер, и индуцибельный характер. Основная функция БТШ70 заключается в их способности временно связываться с частично синтезированными или денатурированными пептидными последовательностями, предотвращая агрегацию и способствуя фолдингу. Также, благодаря их свойству стабилизировать белки в частично свернутом состоянии, БТШ70 способствуют трансмембранному транспорту белков [20, 147]. Показано, что белки семейства БТШ70 широко синтезируются в зародышевых клетках в процессе их развития и созревания [152]. Проведены единичные исследования взаимосвязи между экспрессией БТШ70 и бесплодием у мужчин, однако полученные данные противоречивы [149, 150, 151].

Один из членов семейства БТШ70 HSPA2 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 2) первоначально был идентифицирован в семенниках мышей, в дальнейшем его аналоги были определены в разных видах, что подтверждает, что этот белок может выполнять высококонсервативную функцию во время

сперматогенеза. Исследование человеческого белка HSPA2 выявило его присутствие в нормальных семенниках в сперматоцитах во время мейоза и сперматидеях в ходе спермиогенеза. Предполагается, что HSPA2 участвует в диссоциации синаптонемного комплекса и обеспечении взаимодействия сперматозоидов с zona pellucida яйцеклеток, а его недостаточность приводит к невозможности протекания сперматогенеза дальше профазы 1 мейоза и развитию бесплодия [151, 152, 153].

Белок теплового шока 90 (БТШ90) был обнаружен в клетках гонад человека и животных, где он выполняет важные функции в обеспечении и поддержании мужской фертильности, а также на клеточной поверхности сперматозоидов. БТШ90 регулирует деление половых клеток и участвует в сперматогенезе, формировании цитоскелета сперматозоидов, защите их от окислительного стресса и индукции акросомальной реакции [154, 155]. Известно также, что БТШ90 взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов и играет важную роль в формировании функциональных форм этих рецепторов. Поэтому предполагается, что различия в паттернах экспрессии генов и белков семейства БТШ90 в клетках семенников необходимы для правильной последовательной регуляции функций зародышевых клеток стероидными гормонами, например, тестостероном [146, 156].

Исследования также демонстрируют значительные изменения в локализации и экспрессии БТШ90 в сперматозоидах пациентов с олигоастенозооспермией. Предполагается, что в процессе постмейотической дифференцировки мужских половых клеток БТШ90 вырабатывается, чтобы координировать временную и пространственную активацию киназ семейства TSSKs. Специфичные для семенников серин/треониновые киназы (TSSKs) составляют семейство постмейотических киназ, экспрессируемых в сперматидеях. Они играют важную роль в развитии зародышевых клеток, и, следовательно, вносят свой вклад в формирование фертильности млекопитающих [157]. БТШ90 участвуют в стабилизации и регуляции TSSK. Фармакологическое ингибирование БТШ90 ассоциировано со снижением уровней киназ TSSK в клетках [158].

Экспрессия в клетке белков семейства БТШ60, аналогично БТШ70 и БТШ90, является и конститутивной, и существенно возрастает при воздействии на неё стрессового фактора. Показано, что в клетке БТШ60 локализованы главным образом в митохондриях и на клеточной поверхности. Митохондрии сперматогенных клеток претерпевают значительные морфологические изменения в процессе сперматогенеза [146]. Было исследовано распределение митохондриального БТШ60 и его функции на различных стадиях развития сперматозоидов. Результаты исследования продемонстрировали повышение концентрации белка БТШ60 на этапе митотического деления зародышевых клеток. Биологический смысл данного события заключается в том, что БТШ60 функционирует как молекулярный шаперон в процессе сборки белка и его импорта в митохондрии, и, следовательно, активно пролиферирующим сперматогенным клеткам требуется больше молекул БТШ60, чтобы удовлетворить потребность в образовании новых митохондрий для дочерних клеток [159]. Кроме того, было показано, что низкое количество клеток, экспрессирующих БТШ60, было ассоциировано с нарушением их сперматогенной функции [160].

Таким образом, снижение уровней экспрессии генов и продукции белков семейства теплового шока может быть причиной развития мужского бесплодия невыясненного генеза. Однако, как и в большинстве других клеточных популяций, в клетках семенников экспрессия БТШ быстро возрастает в ответ на неблагоприятные стимулы окружающей среды, например, локальное повышение температуры, наблюдаемое при варикоцеле. Индуцированные гипертермией БТШ играют важную цитопротекторную функцию в предотвращении необратимого повреждения клеточных белков путем связывания с развернутыми или частично неправильно свернутыми пептидами, чтобы замедлить их денатурацию и агрегацию клеточных белков. У многих видов млекопитающих температура семенников должна поддерживаться на более низком уровне, чем температура тканей основных полостей тела [161]. Кроме того, БТШ60, 70 и 90 широко известны своей ролью в инициации иммунного ответа, поскольку являются эндогенными лигандами рецепторов TLR2 и TLR4, и могут являться

патологическим звеном в развитии стерильного воспаления и бесплодия при варикоцеле. О важности точной терморегуляции семенников свидетельствует тот факт, что даже небольшое повышение температуры может оказывать значительное ингибирующее действие на функцию и развитие сперматогенных клеток и является основной причиной мужского бесплодия [19, 162]. Однако точные механизмы патогенеза снижения мужской фертильной функции при нарушении экспрессии генов и выработки БТШ остаются не выясненными до конца и требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, согласно современным представлениям о патогенезе мужского бесплодия, в процесс нарушения репродуктивной функции оказываются вовлечены множество клеточных и гуморальных факторов ВИ. Индукция механизмов ВИ с одной стороны призвана эффективно защищать сперматозоиды в процессе их развития, а с другой — вносит собственный вклад в поддержание воспаления и нарушение их функции. Понимание механизмов ВИ на генетическом, молекулярном и клеточном уровне в патогенезе снижения мужской фертильной функции позволит предложить новые безопасные и эффективные терапевтические стратегии улучшения фертильного потенциала сперматозоидов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика исследуемых групп

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. В качестве биологического материала в настоящей работе исследовали сперматозоиды и семенную жидкость. Материал для исследования был получен 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. После проведения спермограммы биологический материал транспортировали на кафедру иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (зав. каф. д.м.н., проф. М.Р. Хаитов), где проводили молекулярно-генетическую оценку факторов врождённого иммунитета.

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.

Критериями включения в исследование для группы мужчин с ИДБ являлись:

1. Мужской фактор бесплодия неустановленного генеза;
2. Репродуктивный возраст испытуемых (24–45 лет);
3. Согласие испытуемых на участие в исследовании.

Критериями включения в исследование для группы пациентов с варикоцеле являлись:

1. Мужской фактор бесплодия при варикоцеле;
2. Репродуктивный возраст испытуемых (24–45 лет);
3. Согласие испытуемых на участие в исследовании.

Критериями исключения из основных групп являлись:

1. Наличие острых и обострения хронических заболеваний, гидроцеле, паховой грыжи и других заболеваний, негативно влияющих на репродуктивную функцию;

2. Установленный женский фактор бесплодия в паре;

3. Несоблюдение правил подготовки к сдаче эякулята на обследование (употребление больших доз алкоголя, приём антибиотиков, посещение бани или сауны, пренебрежение временем воздержания);

4. Для группы мужчин с ИДБ критерием исключения так же являлось наличие варикоцеле.

Группу сравнения составили 45 здоровых доноров эякулята репродуктивного возраста, от 25 до 37 лет. В данную группу включались доноры с нормальными параметрами спермограммы и без каких-либо нарушений со стороны репродуктивной системы, соматических заболеваний, острых или обострения хронических заболеваний на момент участия в эксперименте.

В соответствии с выбранными критериями были отобраны пациенты с бесплодием. Диагноз «бесплодие» устанавливался врачом-репродуктологом клиники репродуктивной медицины «ВитроКлиник». Там же проводились: сбор анамнеза и эякулята пациентов, спермограмма для оценки состояния фертильных свойств сперматозоидов, разделение эякулята на клеточную фракцию и семенную жидкость; устанавливалось отсутствие женского фактора бесплодия в паре для участников исследования.

2.2 Общая схема исследования

Общий дизайн исследования был разработан в соответствии с поставленной целью и задачами и представлен на рисунке 3.

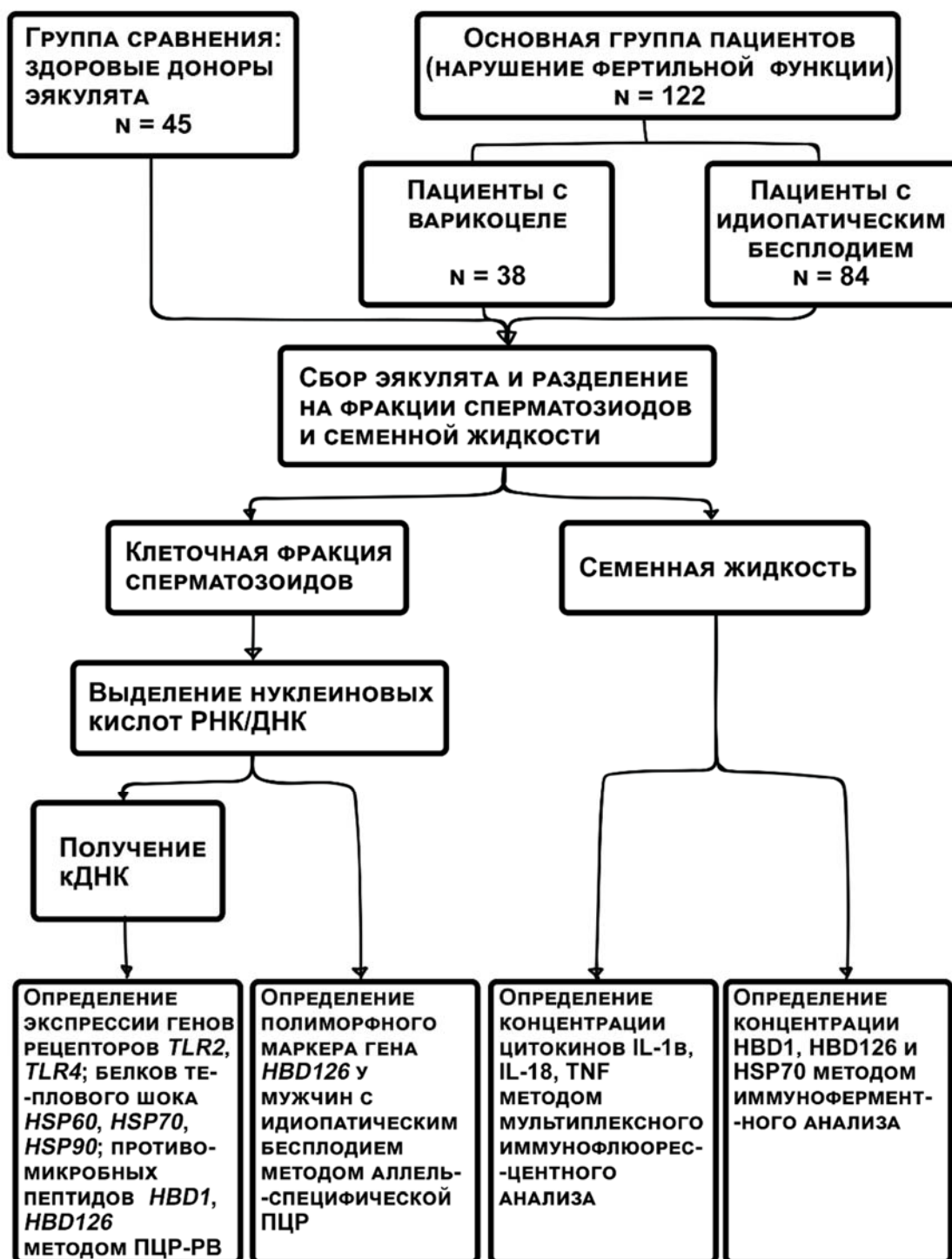


Рисунок 3 – Общая схема эксперимента

Для оценки роли механизмов ВИ в развитии ИДБ на кафедре иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова был разработан комплексный подход, включающий:

1. Оценку экспрессии генов в сперматозоидах β -дефензинов *HBD1* и *HBD126* методом ПЦР-РВ и определение их концентрации в семенной жидкости методом твердофазного ИФА;
2. Выявление носительства мутантного аллеля полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* среди мужчин с ИДБ московской популяции методом аллель-специфической ПЦР;
3. Определение уровней экспрессии генов распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4* методом ПЦР-РВ;
4. Исследование экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах методом ПЦР-РВ и определение содержания HSP70 в семенной жидкости с помощью твердофазного ИФА;
5. Анализ концентрации цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18 в семенной жидкости методом мультиплексного анализа;
6. Проведение корреляционного анализа между выявленными изменениями в системе ВИ и изменением функциональных параметров сперматозоидов, выраженных в спермограммах пациентов.

Нами также был предложен подход к оценке показателей ВИ в сперматозоидах и семенной жидкости бесплодных мужчин, страдающих от варикоцеле, систематизирующий выявляемые изменения, который включает:

1. Изучение экспрессии генов в сперматозоидах белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* методом ПЦР-РВ и концентрации в семенной жидкости пептида HSP70 методом твердофазного ИФА;
2. Определение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах с помощью ПЦР-РВ;
3. Определение концентрации провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18 в семенной жидкости методом мультиплексного анализа;

4. Проведение корреляционного анализа между выявленными изменениями в системе ВИ с изменением функциональных параметров сперматозоидов.

Разработанный подход позволил расширить наши представления о роли механизмов ВИ в иммунопатогенезе нарушения репродуктивной функции различного генеза у мужчин.

Далее представлено подробное описание методов.

2.3 Получение и характеристика биологического материала

В качестве биологического материала в исследовании были использованы образцы эякулята бесплодных мужчин и фертильных доноров. Сбор эякулята, разделение его на фракции сперматозоидов и семенной жидкости методом центрифугирования эякулята в градиенте плотности и определение подвижности, концентрации и морфологического строения сперматозоидов в рамках спермограммы проводилась на базе клиники репродуктивной медицины «ВитроКлиник» сотрудниками диагностической лаборатории в ходе плановых обследований пациентов при планировании семьи [163].

Определение подвижности сперматозоидов

Подвижность сперматозоидов определяли методом фазово-контрастной микроскопии согласно рекомендациям ВОЗ [163].

Процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов связывают с эффективностью наступления беременности, поэтому изучение подвижности сперматозоидов, влияющих на неё факторов и корреляции с другими биохимическими показателями мужской репродуктивной системы является актуальной задачей и клинической, и фундаментальной медицины. Выделяют следующие категории подвижности сперматозоидов:

Категория А характеризуется прогрессивной подвижностью сперматозоидов,двигающихся с высокой скоростью по линейной траектории или по кругу широкого радиуса;

Категорию В составляют слабоподвижные сперматозоиды, сохранившие тенденцию к линейному перемещению идвигающиеся с низкой скоростью с покачиваниями;

Категория С включает в себя сперматозоиды, имеющие аномалии строения шейки или хвоста, в связи с чем они двигаются вокруг своей оси или маятникообразно на одном месте;

Категория D — неподвижные сперматозоиды.

У мужчины с достаточной фертильностью в эякуляте обнаруживается не менее 20% сперматозоидов типа А и не менее 30% клеток типа В. При снижении суммарного процентного содержания сперматозоидов категорий (А+В), % диагностируют астенозооспермию разной степени тяжести:

1 степень — слабовыраженная или незначительная. Суммарное содержание сперматозоидов (А+В) составляет 41–50%;

2 степень — умеренно выраженные нарушения. Суммарное процентное содержание (А + В) составляет 30–40%;

3 степень — тяжелая астенозооспермия. Количество активных клеток (А+В) менее 29%, преобладают сперматозоиды с непрогрессивным движением или неподвижные.

Определение количества сперматозоидов в эякуляте

Общее количество сперматозоидов в эякуляте и их концентрация являются параметрами, связанными с репродуктивными исходами и их успешностью. Число сперматозоидов в эякуляте рассчитывают из концентрации сперматозоидов при проведении спермограммы. Концентрация сперматозоидов представляет собой число клеток на единицу объёма эякулята. Общее число сперматозоидов есть суммарное число сперматозоидов во всем эякуляте, которое получают при

умножении концентрации сперматозоидов в 1 мл на объём эякулята. Подсчёт сперматозоидов проводился методом фазово-контрастной микроскопии с использованием гемоцитометра Нэйбауэра согласно протоколу, описанному в руководстве ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека [163].

В норме данный показатель составляет не менее 20 млн сперматозоидов в 1 мл объёма или не менее 40 млн во всем объёме. Состояние эякулята с меньшим количеством сперматозоидов характеризуется как «олигозооспермия».

Определение морфологии сперматозоидов

Морфологическое строение сперматозоидов определялось по Крюгеру в соответствии с рекомендациями ВОЗ [163]. Данная характеристика отражает ассоциацию между процентом морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте и фертильностью. Согласно критериям Крюгера сперматозоид оценивают целиком и определяют процент внешне идеальных клеток. Какие-либо нарушения в строении головки, шейки и хвоста считаются дефектом. Минимальный референсный порог для данного метода оценки составляет 4%, при котором вероятность наступления беременности считается высокой. Состояние эякулята с меньшим количеством морфологически нормальных форм сперматозоидов характеризуется как «тератозооспермия».

Получение очищенной фракции сперматозоидов и семенной жидкости методом центрифугирования эякулята в градиенте плотностей

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 протоколом производителя. Данный метод предпочтителен для использования в исследовательских целях в случае наличия олигозооспермии, тератозооспермии или астенозооспермии среди испытуемых,

так как он позволяет получить фракцию наиболее подвижных сперматозоидов с нормальной морфологией, очищенных от округлых клеток, лейкоцитов, дегенерирующих половых клеток и клеточного дедбриса.

Принцип метода заключается в центрифугировании образца эякулята через градиент, образованный двумя слоями растворов с возрастающей плотностью — 90% и 45%, содержащих различные концентрации частиц коллоидного кремния, покрытых силаном. Метод основан на разделении компонентов эякулята по их удельному весу и плотности. Подвижные сперматозоиды с нормальной морфологией активно проникают через градиент, формируя осадок на дне пробирки, свободный от клеточного дедбриса, лейкоцитов, округлых клеток и дегенерирующих половых клеток.

Образец эякулята наслаивается поверх градиента. При центрифугировании разные клетки занимают определенное положение, при котором их плотность соответствует плотности градиента. Данное разделение основано на том, что зрелые сперматозоиды содержат более плотно сконденсированный хроматин и большую плотность, чем 90% раствор, поэтому они способны проходить сквозь него и оседать на дне пробирки. Сперматозоиды, оседающие на дно, обладают наибольшей подвижностью. Незрелые и дегенерирующие сперматозоиды и другие клетки не проходят через слои растворов и не оседают на дно пробирок (рисунок 4).

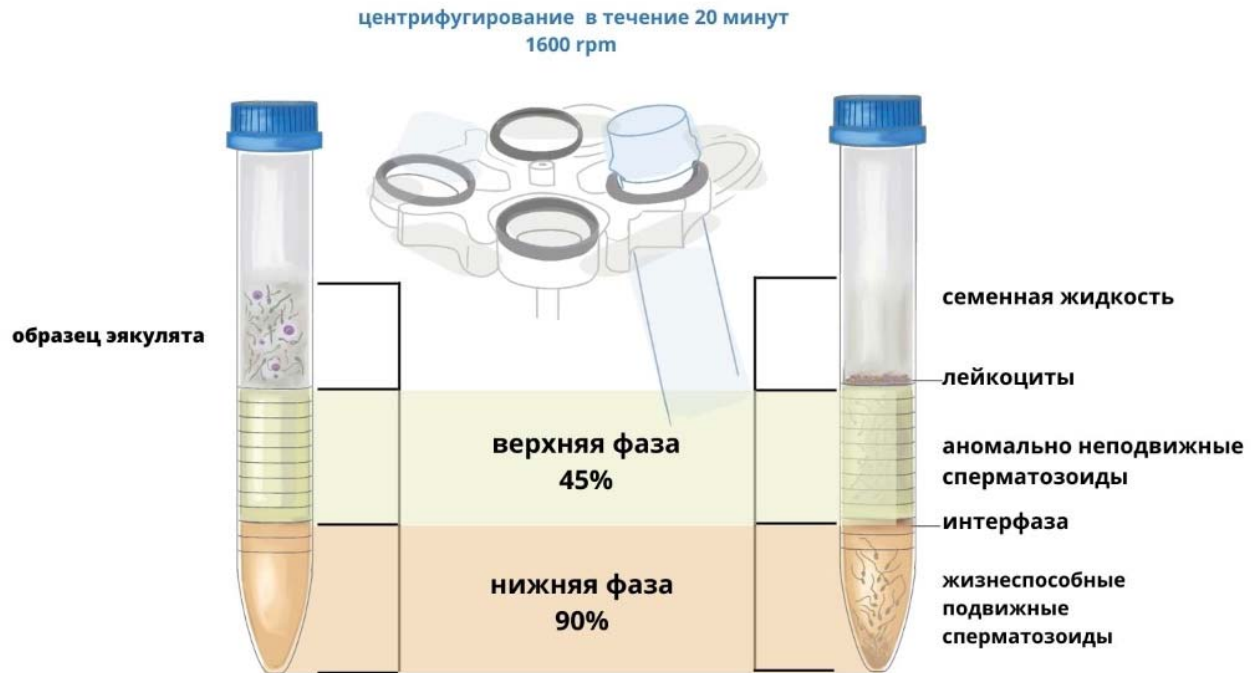


Рисунок 4 – Разделение эякулята на сперматозоиды и семенную жидкость методом центрифугирования в градиенте плотностей

После определения функциональных параметров сперматозоидов и разделения эякулята на фракции сперматозоидов и семенной жидкости биоматериал транспортировали в течение часа в лабораторию кафедры иммунологии МБФ (зав. каф. проф., д.м.н. М.Р. Хаитов), где проводили комплексную оценку факторов врожденного иммунитета в эякуляте бесплодных мужчин.

2.4. Выделение нуклеиновых кислот из сперматозоидов человека

Экстракция нуклеиновых кислот из очищенной фракции сперматозоидов пациентов исследуемых групп проводилась с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот «Набор для выделения ДНК/РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» (Интерлабсервис, РФ), который позволяет выделять ДНК и РНК из исследуемого биоматериала. Принцип метода основан на сорбции нуклеиновых кислот на

частицах силикагеля и многократной отмывке от белков, мембран и других клеточных компонентов. При участии гуанидин тиоционата, который является хаотропным агентом и входит в состав лизирующего буфера, происходит лизис клеточных белков и сорбция нуклеиновых кислот на силикагеле. Все действия выполнялись согласно следующему протоколу:

1. Подготавливали пробирки типа Эппендорф емкостью 1,5 мл на 1-2 больше, чем количество исследуемых образцов;
2. Прогревали на термостате «Термит» (ДНК-Технология, РФ) лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 при температуре 62 °С до полного растворения кристаллов;
3. В пробирки добавляли по 450 мкл лизирующего раствора и вносили 100 мкл образца или деионизированной воды, использовавшейся в качестве отрицательного контроля образца;
4. Содержимое пробирок перемешивали с использованием центрифуги-вортекса «Микроскопин FV-2400» (Biossan, Латвия), затем центрифугировали 5 секунд при 5000 об/мин;
5. Ресуспендировали сорбент на вортексе и вносили в пробирки по 25 мкл сорбента, перемешивали на вортексе, оставляли в штативе на 1 мин, снова вортексировали и оставляли на 10 минут. Далее центрифугировали 30 секунд при 10 тыс. об/мин;
6. Не захватывая сорбент, отбирали надосадочную жидкость дозатором с использованием отдельного наконечника для каждой пробы и добавляли по 400 мкл раствора для отмывки 1, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 10 тыс. об/мин 30 секунд;
7. Удаляли надосадочную жидкость дозатором с использованием отдельного наконечника для каждой пробы и добавляли по 500 мкл раствора для отмывки 3, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 10 тыс. об/мин 30 секунд;
8. Удаляли надосадочную жидкость и повторяли отмывку раствором для отмывки 3;

9. Добавляли в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 10 тыс. об/мин 30 секунд, после чего удаляли надосадочную жидкость дозатором с использованием отдельного наконечника для каждой пробы;

10. Инкубировали осевший на дно пробирок сорбент в термостате при 60 °С 15 минут, при этом крышки пробирок были открыты;

11. Добавляли в эппендорфы для изучения экспрессии генов по 50 мкл РНК-буфера, перемешивали на вортексе и снова помещали пробирки в термостат при температуре 60 °С на 2–3 минуты;

12. Перемешивали на вортексе и центрифугировали эппендорфы на максимальных оборотах (13–14 тыс. об/мин) 1 минуту;

13. Отбирали надосадочную жидкость пипеткой в стерильную пробирку, не захватывая при этом сорбент. Полученная надосадочная жидкость содержала очищенную РНК и ДНК, готовую для дальнейшего исследования. Стерильные пробирки с образцами нуклеиновых кислот всех исследуемых пациентов маркировались и хранились при температуре –80 °С.

Концентрацию полученных нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, США). Для этого вносили 1 мкл полученной РНК на неподвижный модуль, сверху опускали подвижную часть анализатора так, чтобы между модулями прибора образовывался столбик жидкости. Прибор измеряет поглощение света в образце. С помощью программы Nucleic Acid при длине волны 260 нм определяли концентрацию РНК в исследуемом образце. В качестве чистого контроля использовали ddH₂O. Для количественного определения содержания нуклеиновых кислот в приборе используется видоизмененное уравнение Ламберта-Бера, которое имеет следующий вид:

$$c = (A * \epsilon) / b,$$

где c — концентрация нуклеиновой кислоты (нг/мкл); A — поглощение в единицах оптической плотности; ϵ — зависимый от длины волны коэффициент экстинкции, нг*см/мкл (для РНК = 40 нг*см/мкл); b — длина оптического пути, см.

По значению соотношения 260/280 оценивали степень чистоты нуклеиновых кислот, которое составляет ~ 2,0 для «чистой» РНК. Дополнительным критерием чистоты образца является соотношение 260/230, и его величина находится в интервале 1,8–2,2. Если величина вышеуказанных соотношений находится ниже данных значений, то это может свидетельствовать о наличии загрязнителей в пробе и её непригодности для проведения исследования.

2.5 Определение экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90*, *DEFB1*, *DEFB126* методом ПЦР в режиме реального времени

2.5.1 Получение кДНК с помощью реакции обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК исследуемого гена для последующей постановки ПЦР в режиме реального времени. Общий объем реакционной смеси на одну пробирку составил 25 мкл. В качестве отрицательного контроля в пробирку добавляли деионизированную воду (ddH₂O), входящую в состав набора (таблица 1).

Таблица 1 – Объемы реактивов для приготовления реакционной смеси для проведения реакции обратной транскрипции

Приготовление смеси №1	
Реагент	Объем, мкл
Праймер Oligo(dT)15, 15 ОЕ/мл	1
ddH ₂ O	14
РНК-матрица	4
Общий объем смеси на 1 пробу	19
Приготовление смеси №2	
Реагент	Объем, мкл
MMLV-RT, 50 ед/мкл	1
2,5X Реакционная смесь	10
Общий объем смеси на 1 пробу	11

Постановка реакции ОТ проводится в два последовательных этапа с приготовлением смеси №1 и смеси №2. В отдельном эппендорфе (0,6 мл) готовили смесь №1: 1 мкл праймера Oligo(dT) [15 ОЕ/мл] и 14 мкл ddH₂O. Приготовленную смесь №1 раскапывали по пробиркам по 15 мкл на одну пробу. Добавляли 4 мкл РНК, а в пробирку с отрицательным контролем вносили 4 мкл ddH₂O, перемешивали с помощью вортекса (Микроспин FV-2400, BioSan) и помещали в термостат «Термит» («ДНК-технология», РФ). Инкубировали 5 мин при температуре 67 °С для отжига праймеров. В отдельном эппендорфе готовили смесь №2 (таблица 1). Пробирки после инкубации охлаждали до 4 °С и при 4 °С в них вносили по 11 мкл смеси №2, инкубировали в термостате при следующем температурно-временном режиме: 40 °С — 50 мин, 95 °С — 10 мин. Полученную после проведения реакции ОТ кДНК хранили при температуре -70 °С для дальнейшего проведения ПЦР-РВ.

2.5.2 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для определения экспрессии изучаемых генов использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и праймеров, синтезированных фирмой «Синтол», РФ. Системы для определения экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90*, *DEFB1*, *DEFB126* были отработаны ранее на кафедре иммунологии МБФ [20, 164]. Последовательности праймеров были взяты из базы данных PubMed - NCBI.

Общий объем реакционной смеси составил 25 мкл. Для каждой системы для определения экспрессии исследуемых генов выделялись опытные пробирки, отрицательный контроль ОТ и отрицательный контроль ПЦР. Объемы реактивов для проведения ПЦР-РВ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Объемы реактивов для приготовления реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ

Приготовление смеси для ПЦР-РВ	Объем, мкл
Прямой праймер (<i>TLR2 / TLR4 / HSP60 / HSP70 / HSP90 / DEFB1 / DEFB126 / Actin</i>), 10 пкмоль/мкл	1
Обратный праймер (<i>TLR2 / TLR4 / HSP60 / HSP70 / HSP90 / DEFB1 / DEFB126 / Actin</i>) 10 пкмоль/мкл	1
Тақ ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,3
dNTP, 2,5 мМ	2,5
10 х буфер SYBR Green I	2,5
MgCl ₂ , 25 мМ	2,5
dd H ₂ O	12,2
Общий объем смеси на 1 пробу	21

Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I», (Синтол, РФ) и добавляли в пробирки по 21 мкл, и добавляли по 4 мкл пробы кДНК, полученных с помощью реакции ОТ (таблица 2). В качестве контроля использовали две пробы: реакционная смесь + dd H₂O (К-) и реакционная смесь + отрицательный контроль реакции ОТ (ОТК-).

Реакцию ПЦР-РВ проводили на ПЦР-амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Germany) в температурно-временном режиме, представленном в таблице 3.

Таблица 3 – Температурно-временной режим программы для проведения ПЦР-РВ

Праймеры	Температура, °C			Время, мин	Количество циклов
	<i>HSP60, HSP90, TLR4, TLR2, HBD126, Act</i>	<i>HSP70</i>	<i>HBD1</i>		
1	94			2:00	1
2	94	94	94	00:30	35
	64	69	55	1:00	
	95	95	90	1:00	
3	4			хранение	

После проведения ПЦР-РВ получали зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов амплификации (рисунок 5). Рост кривой свидетельствует о накоплении амплификата. Полученные данные после ПЦР-амплификации по каждому из исследуемых генов пересчитывались методом $\Delta\Delta C_t$ относительно гена домашнего хозяйства β -актина, т.к. его экспрессия клетками стабильна и не зависит от внешних сигналов.

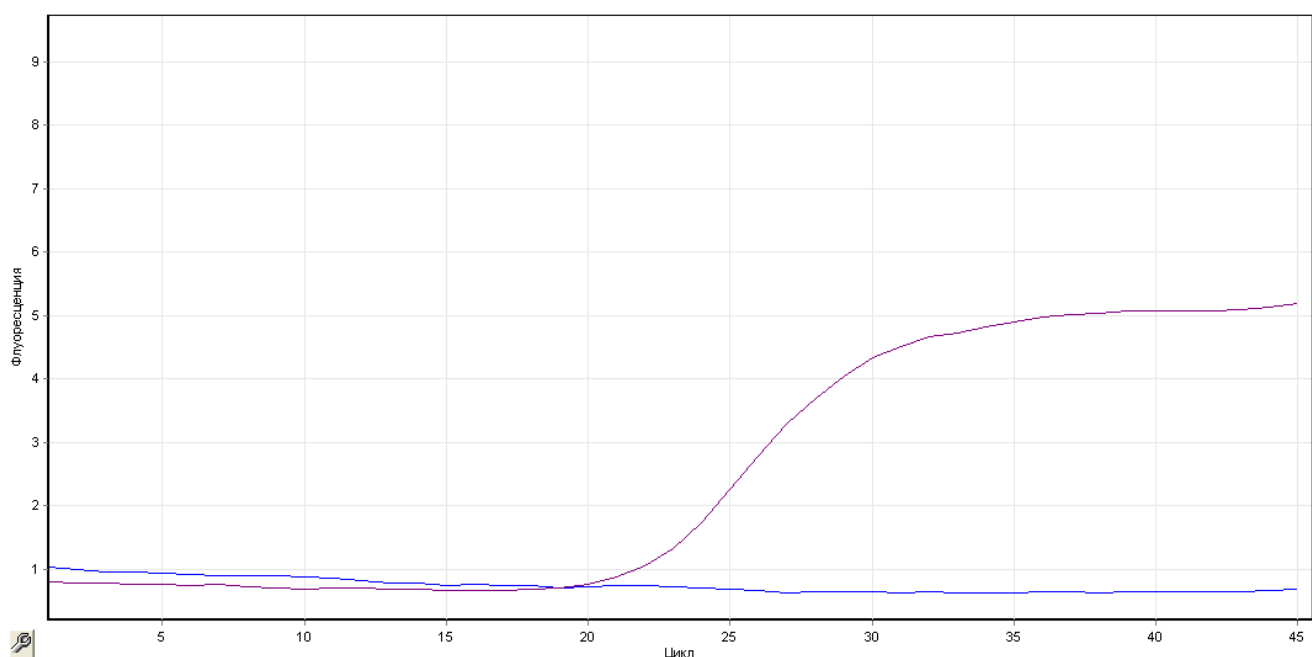


Рисунок 5 – Зависимость интенсивности флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I в зависимости от времени амплификации гена *DEFB126*. По оси абсцисс отложен номер цикла ПЦР-амплификации, по оси ординат — флуоресценция SYBR Green I

Анализ экспрессии генов был проведен с помощью метода ПЦР-РВ с использованием обратной транскрипции. Уровень экспрессии генов определяли относительно референтного образца с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [164, 165]. Результаты получены в виде относительных единиц RQ (relative quantity), показывающих, во сколько раз снижается или повышается экспрессия гена-мишени в исследуемом образце по отношению к референтному образцу. В качестве эндогенного контроля был использован ген β -актина, являющегося «геном домашнего хозяйства» (housekeeping gene) и имеющего стабильный уровень экспрессии в разных клетках при различных условиях.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR) широко используется для количественной оценки уровней экспрессии генов. Относительная оценка определяет изменения в экспрессии генов по сравнению с другими образцами и выполняется проще, чем абсолютная, и требует меньшего расхода реагентов, поскольку нет необходимости расчета стандартной кривой. Кроме того, данный метод позволяет избежать ошибок, связанных со стандартными разведениями для построения стандартной кривой. Также в зависимости от концепции исследования, относительное количество копий генов между двумя группами может представлять больший интерес, чем точные концентрации ДНК/РНК [165].

Метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ представляет собой метод относительной количественной оценки, который наиболее часто применяется в научных исследованиях. Пороговый цикл (C_t) — это цикл, при котором уровень флюоресценции достигает определенной величины (порога).

На сегодняшний день разработаны различные математические модели для вычисления относительной экспрессии (R), основанные на сравнении разностей циклов, на которых концентрация продукта начинает превышать пороговое значение. Установлена общая процедура расчета относительного коэффициента:

Показатель « ΔC_t » или « $\Delta\Delta C_t$ » — это метод без поправки на эффективность, т.к. предполагается, что по окончании каждого последующего цикла происходит удвоение ДНК-матрицы:

$$R = 2^{[Ct \text{ исследуемого гена} - Ct \text{ контроля}]}$$

$$R = 2^{\Delta Ct}$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ образец} - \Delta Ct \text{ контроль}]}$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta Ct},$$

где Ct — cycle treshhold, R — относительная экспрессия гена, образец — исследуемый ген, контроль — ген домашнего хозяйства.

Экспрессия генов в работе представлена в относительных единицах (отн. ед.).

2.6 Определение носительства полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида *HBD126*

Анализ генотипа *HBD126* rs11468374 мужчин с ИДБ 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). Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I», (Синтол, РФ), 21 мкл которой вносили в пробирки и добавляли по 4 мкл пробы геномной ДНК. С образцом выделенной геномной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Последовательности аллель-специфичных праймеров для определения мутации в гомозиготном состоянии *del/del HBD126* и для определения аллеля дикого типа в гомозиготном состоянии *wt/wt HBD126* были синтезированы фирмой «Синтол» (РФ).

Подготавливали 2 рабочие смеси (таблица 4): с реакционной смесью с парой праймеров на аллель 1 — дикий тип (*WT HBD126*) и с реакционной смесью с парой праймеров на аллель 2 — мутантный тип (*DEL HBD126*). Образец из каждой анализируемой пробы вносили в пробирку с реакционной смесью аллель 1 и реакционной смесью аллель 2. Результаты анализа позволяют получить три типа заключений: гомозигота по аллели 1, гетерозигота, гомозигота по аллели 2.

Таблица 4 – Реакционная смесь для определения генотипа *HBD126* rs11468374 методом аллель-специфической ПЦР

Приготовление смеси для ПЦР	Объем, мкл
Прямой праймер (<i>HBD126 WT / HBD126 DEL</i>), 10 пкмоль/мкл	1
Обратный праймер (<i>HBD126 WT / HBD126 DEL</i>), 10 пкмоль/мкл	1
Taq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,3
dNTP, 2,5 мМ	2,5
10 x буфер SYBR Green I	2,5
MgCl ₂ , 25 мМ	2,5
dd H ₂ O	12,2
Общий объем смеси на 1 пробу	21

Реакцию ПЦР-РВ проводили на ПЦР-амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Germany) со следующим температурным режимом:

1. Денатурация 94 °С — 3 минуты;
2. Амплификация (отжиг 94 °С — 60 секунд, элонгация 60 °С — 20 секунд, экстенция 72 °С — 1 мин) 35 циклов;
3. Финальная экстенция 72 °С — 7 минут.

Результат считался положительным, если значение Ct образца < 27, и отрицательным, если значение Ct образца > 30. Так,

– Значение Ct < 27 для пробы с реакционной смесью с праймером WT и Ct > 30 для пробы с реакционной смесью с праймером DEL — пациент не является носителем мутации, генотип WT/WT;

– Значение Ct < 27 для пробы с реакционной смесью с праймером WT и Ct < 27 для пробы с реакционной смесью с праймером DEL — пациент является носителем мутации в гетерозиготном положении, генотип WT/DEL;

– Значение Ct > 30 для пробы с реакционной смесью с праймером WT и Ct < 27 для пробы с реакционной смесью с праймером DEL — пациент является носителем мутации в гомозиготном положении, генотип DEL/DEL;

– Значение $Ct > 30$ для пробы с реакционной смесью с праймером WT и $Ct > 30$ для пробы с реакционной смесью с праймером DEL — реакция амплификации не прошла.

2.7 Определение содержания HBD1, HBD126, HSP70 в семенной плазме методом иммуноферментного анализа

Для определения концентрации противомикробных пептидов HBD1 и HBD126 и белка теплового шока HSP70 в образцах семенной жидкости бесплодных мужчин использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (коммерческие наборы для иммуноферментного анализа фирм Cloud-Clone Corp., USA и Enzo Life Science Inc., Switzerland).

Принцип метода основывается на связывании исследуемых веществ со специфическими антителами, сорбированными в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат — биотинилированные поликлональные антитела — связывают аналит, захваченный первыми антителами. После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется следующий конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин и конъюгированный с антителами к аналиту. После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Оценка концентрации белка HBD1 в семенной жидкости проводилась с использованием коммерческого набора реагентов для количественного определения бета-дефинзина 1 методом твердофазного иммуноферментного анализа (HBD1 кат. № SEB373Hu, Cloud-Clone Corp., Houston, USA; поставщик BioChemMask, Москва, Россия). Оценка концентрации пептида HBD126 — с использованием коммерческого набора реагентов для количественного определения бета-дефинзина 126 методом твердофазного иммуноферментного

анализа (HBD126 кат. № SEQ483Hu, Cloud-Clone Corp., Houston, USA; поставщик BioChemMack, Москва, Россия). Анализ проводился в соответствии с методикой, описанной в инструкции. Диапазон детекции концентрации для HBD1 составлял 0.312–20 ng/mL, минимальная определяемая концентрация данного набора менее 0.124 ng/mL. Учитывая, что предполагаемая концентрация белка HBD1, согласно данным литературы, в образцах превышает 20 нг/мл, образцы предварительно были разведены в 20 раз [135]. Для HBD126, согласно инструкции производителя, диапазон детекции концентрации составил 7.8–500 pg/mL, минимальная определяемая концентрация набора составляет менее 3.0 pg/mL. Образцы предварительно были разведены в 10 раз.

Оценка концентрации белка HSP70 в семенной жидкости проводилась с использованием коммерческого набора реагентов для количественного определения белка теплового шока HSP70 методом твердофазного иммуноферментного анализа (HSP70 кат. № ADI-EKS-715, Enzo Life Science Inc., Lauson, Switzerland). Анализ проводился в соответствии с методикой, описанной в инструкции. Диапазон детекции концентрации для HSP70 составлял 0.20–12.5 ng/mL, минимальная определяемая концентрация данного набора менее 0.09 ng/mL. Образцы предварительно были разведены в 4 раза согласно рекомендациям производителя.

Результаты учитывали на микропланшетном фотометре Anthos 2020 (BCA, Lowry, Bradford) при длине волны 450 нм. На основании данных полученных для стандартных образцов автоматически строилась калибровочная кривая, по которой затем определяли концентрацию цитокинов в образцах. Содержание исследуемых анализов представлено в пикограммах в пересчёте на миллиграмм белка.

2.8 Измерение концентрации цитокинов в семенной жидкости методом мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа

Для определения содержания цитокинов IL-1 β , IL-18, TNF в семенной жидкости мужчин с бесплодием и доноров группы сравнения проводили

мультиплексный иммунофлюоресцентный анализ (Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader, USA) с помощью набора Bio-Plex Pro Assays строго по протоколу фирмы-производителя. Технология мультиплексирования MAGPIX основана на использовании наборов магнитных микросфер диаметром $d = 5,6$ мкм, которые являются носителями флуоресцентных веществ. На поверхности микросфер располагаются молекулы, обладающие свойством специфического взаимодействия с анализируемыми молекулами по принципу образования комплекса антиген-антитело. Сами частицы в момент считывания находятся в иммобилизованном состоянии и удерживаются магнитами, т.е. частицы располагаются в одной плоскости, что позволяет сделать считывание более эффективным.

Благодаря «цветовой» кодировке сфер данная методика позволяет проводить мультиплексный анализ и определять до 50 различных мишеней в одном образце. Детекция иммунных комплексов и самих микросфер осуществляется при помощи регистрации флуоресценции CCD-камерой, которая детектирует свечение флуорофоров самой сферы и свечение иммунного комплекса.

2.9 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Данные были проверены на нормальность распределения (критерий Колмагорова-Смирнова), определены их дисперсии. Для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, сравнение исследуемых групп проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Для выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, применяли непараметрический аналог дисперсионного анализа — 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 *DEFB126* определяли прямым подсчетом. Для оценки степени различий в частоте встречаемости генотипов между исследуемыми группами использовался точный критерий χ^2 Пирсона. При этом рассчитывали коэффициент отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (DI), а также p-значение. Соответствие распределения генотипов в обследованных группах каноническому распределению Харди–Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Уровень достоверности принимали $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эякулят мужчин состоит из сперматозоидов и семенной жидкости и содержит множество иммунных факторов, которые участвуют в поддержании и обеспечении фертильности, напрямую влияя на сперматозоиды. Факторы ВИ, представленные в мужском репродуктивном тракте и эякуляте, призваны выполнять две основные функции. С одной стороны, им необходимо обеспечивать быструю и эффективную защиту от внедряющихся патогенов на уровне первой линии защиты организма до индукции адаптивного ответа, чтобы избежать возможной аутоагрессии в отношении антигенов сперматозоидов. С другой, эти факторы выполняют свои специфические функции, участвуя в процессах сперматогенеза и репродукции. Кроме того, при избыточной активации компоненты врождённого иммунитета опосредуют развитие воспалительного процесса, негативно сказывающегося на характеристиках сперматозоидов, и таким образом, становятся звеньями патогенеза в нарушении фертильной функции.

Перед нами стояла задача исследовать показатели врождённого иммунитета на уровне эякулята мужчин, страдающих от бесплодия различного генеза — идиопатического и бесплодия, вызванного варикоцеле. Для этого был разработан комплексный подход, включающий: оценку экспрессии генов распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2*, *TLR4*, белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90*, противомикробных пептидов *HBD1*, *HBD126*, и концентрацию в семенной жидкости эффекторных пептидов *HBD1*, *HBD126*, *HSP70*, *IL-1 β* , *IL-18*, *TNF*; а также ассоциацию выявляемых изменений в системе врождённого иммунитета с нарушениями в параметрах спермограмм пациентов.

3.1 Анализ функциональных параметров сперматозоидов пациентов с бесплодием

На первом этапе исследования нами были проанализированы параметры спермограмм пациентов с идиопатическим бесплодием ($n = 84$) и варикоцеле ($n = 38$). Оценка эякулята в рамках спермограммы проводилась сотрудниками клинико-диагностической лаборатории клиники репродуктивной медицины «ВитроКлиник».

Нами был проведен статистический анализ данных, полученных в ходе лабораторного исследования эякулята мужчин, и по результатам этого анализа испытуемые с идиопатическим бесплодием 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 АЗС $n = 31$, (подвижность сперматозоидов составляла 30–40%);

3. Пациенты с тяжелой степенью АЗС, $n = 26$, (подвижность сперматозоидов составляла 1–29%).

Функциональные параметры (концентрация, подвижность и морфологическое строение) сперматозоидов исследуемых групп мужчин с ИДБ приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика 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;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, $p \leq 0,01$.

Показатели концентрации, подвижности и морфологического строения сперматозоидов в эякуляте мужчин группы 1 и группы сравнения были сопоставимы.

Мы определили, что подвижность сперматозоидов доноров здоровой группы достоверно выше в 3,7 раза этого показателя среди пациентов с бесплодием группы 3 ($p \leq 0,01$; здесь и далее: сравнение групп пациентов с группой здоровых мужчин и между собой проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса и теста Данна для множественных сравнений). Показатель подвижности сперматозоидов пациентов группы 2 с умеренно выраженной АЗС также достоверно отличался от такового показателя группы сравнения в 1,4 раза ($p < 0,01$). Подвижность сперматозоидов пациентов группы 1 была выше в 1,3 раза ($p < 0,01$) и в 3,5 раза ($p < 0,01$), чем в группах пациентов 2 и 3, соответственно.

Нормальный показатель концентрации сперматозоидов в эякуляте составляет 15 млн/мл и более, таким образом, пациенты всех исследуемых групп демонстрировали уровни этого показателя в пределах нормы. Однако в группе пациентов с нормозооспермией концентрация сперматозоидов достоверно

превышала таковой показатель группы пациентов с тяжелой степенью астенозооспермии в 6 раз ($p < 0,001$).

Морфологическое строение сперматозоидов пациентов всех исследуемых групп имело значимые отличия в сравнении с показателями здоровой группы ($p < 0,01$). Эякулят бесплодных мужчин группы 3 демонстрировал содержание наименьшего количество сперматозоидов нормальной морфологии ($p < 0,01$). Достоверных отличий по количеству морфологически нормальных форм сперматозоидов между пациентами разных групп выявлено не было. Согласно последним рекомендациям ВОЗ, сперматозоидов с нормальной морфологией должно быть более 14% для успешного достижения беременности, и таким образом, эякулят пациентов гр. 2 и 3 характеризуется тератозооспермией.

Среди причин, ведущих к бесплодию, варикоцеле занимает второе место в мире по распространенности. На фоне данной патологии отклонения от нормы в показателях фертильности сперматозоидов наблюдаются более, чем у 40% пациентов, поэтому далее нами были проанализированы результаты спермограмм пациентов с варикоцеле.

В таблице 6 приведены функциональные параметры сперматозоидов мужчин с варикоцеле в сравнении со здоровыми мужчинами.

Таблица 6 – Функциональные параметры сперматозоидов пациентов с варикоцеле и доноров группы сравнения

Параметр	Группа пациентов с варикоцеле	Группа сравнения
Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6$ /мл	56 (27; 86) **	138 (79,5; 305)
Подвижность сперматозоидов, (A+B), %	35 (20; 41)**	49 (45; 50)
Морфология сперматозоидов, %	16 (15; 16)*	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, $p \leq 0,01$.

При сравнении параметров спермограмм пациентов с варикоцеле и фертильных доноров эякулята были определены значимые отличия. Эякулят пациентов с варикоцеле характеризовался снижением концентрации сперматозоидов в 2,5 раза ($p < 0,01$); снижением количества сперматозоидов нормальной морфологии в 1,8 раза ($p < 0,05$); подвижность сперматозоидов была снижена в 1,4 раза ($p < 0,01$) в сравнении со здоровыми мужчинами.

Проведение спермограммы и ее интерпретация являются общепризнанным и оптимальным способом оценки репродуктивной функции мужчины и функционально-морфологического состояния его сперматозоидов, однако этот метод не позволяет установить причину бесплодия неясного генеза в виду визуальности и субъективности исследования, а также не учитывает биохимические особенности изучаемых клеток. Таким образом, результаты данного исследования не всегда являются надежными т.к. фертильность бывает сохранена даже при значительных отклонениях показателей спермограммы от нормы, в то время как бесплодие может наблюдаться и у мужчин с нормозооспермией, и наша дальнейшая работа была посвящена поиску биохимических и молекулярно-генетических маркеров снижения фертильной функции сперматозоидов.

3.2 Исследование показателей врождённого иммунитета в эякуляте пациентов с идиопатическим бесплодием

При оценке данных литературы нами были определены значимые молекулы и механизмы врождённого иммунитета, играющие важную роль в становлении фертильных свойств сперматозоидов. Исходя из проведенного анализа, нами был разработан комплексный подход для оценки роли механизмов ВИ в развитии ИДБ, включающий:

1. Оценку экспрессии генов в сперматозоидах β -дефензинов *HBD1* и *HBD126* и определение их концентрации в семенной жидкости;

2. Выявление носительства мутантного аллеля полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* среди мужчин с ИДБ московской популяции;
3. Определение уровней экспрессии генов распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4*;
4. Исследование экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и определение содержания *HSP70* в семенной жидкости;
5. Анализ концентрации цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18 в семенной жидкости;
6. Проведение корреляционного анализа между выявленными изменениями в системе ВИ и изменением функциональных параметров сперматозоидов, выраженных в спермограммах пациентов.

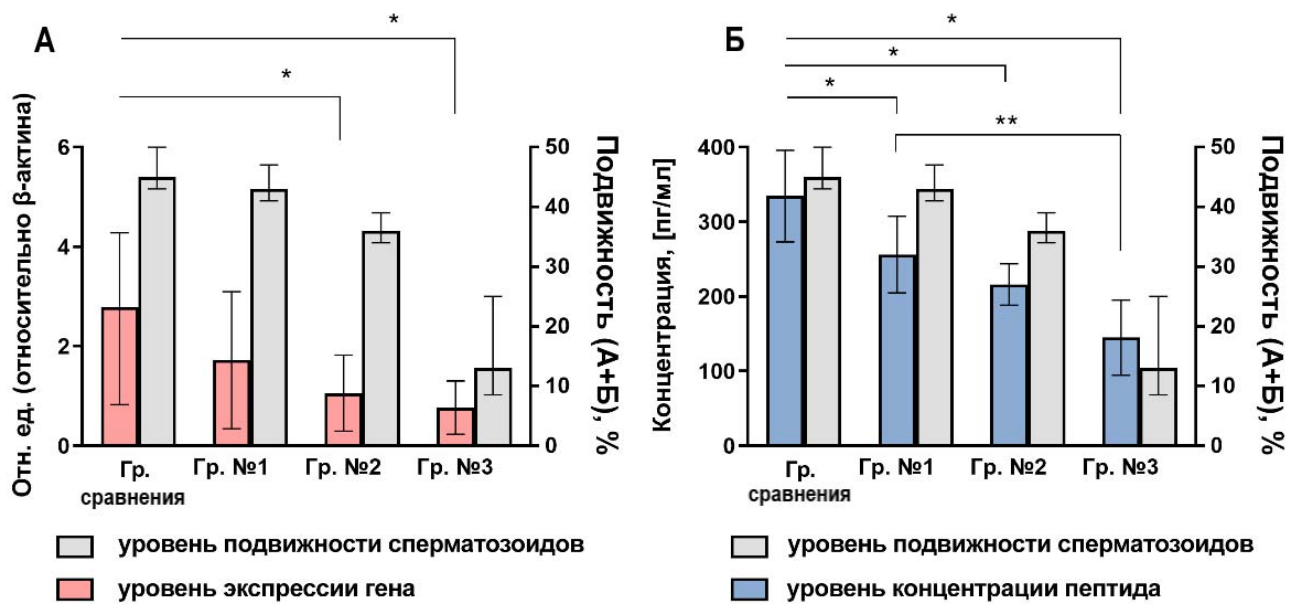
Далее представлены полученные на каждом из представленных этапов результаты исследования и их обсуждение.

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

Перед нами стояла задача оценить влияние пептидов семейства β -дефензинов на фертильную функцию сперматозоидов мужчин с ИДБ, и потому важным этапом нашего исследования явилось изучение противомикробных пептидов *HBD1* и *HBD126* на уровне эякулята мужчин с бесплодием неустановленного генеза. Роль обозначенных β -дефензинов в процессах репродукции не ограничивается формированием локальной антимикробной защиты. Пептид *HBD1* вырабатывается мужскими половыми клетками на всех стадиях их развития, определяется как на поверхности сперматозоидов, так и в семенной жидкости, и обладает способностью регулировать CCR6-зависимую мобилизацию ионов кальция Ca⁺⁺, необходимого для поддержания функциональной активности сперматозоидов [97]. Дефензин *HBD126* входит в

состав структуры нормального гликокаликса мужских половых клеток, обеспечивает их миграцию, защищает от факторов агрессии окружающей среды, а также участвует в процессе оплодотворения яйцеклетки [17].

Исходя из поставленной задачи, на следующем этапе исследования мы оценивали экспрессию гена *HBD1* в сперматозоидах и концентрацию HBD1 в семенной жидкости и пациентов с идиопатическим бесплодием (рисунок 6: А, Б соответственно).



Примечания: * – статистически значимое отличие от группы сравнения, $p \leq 0,05$, ** – статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ, $p \leq 0,05$. Данные уровней концентрации и экспрессии представлены в виде $Mean \pm SD$. Данные уровней подвижности представлены в виде $Me (Q1; Q3)$.

Здесь и далее: Гр. 1 — пациенты с ИДБ с нормозооспермией или незначительной астенозооспермией (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 6 – Экспрессия гена *HBD1* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида HBD1 в семенной жидкости (Б) у мужчин идиопатическим бесплодием и здоровых доноров.

Нами было продемонстрировано, что экспрессия гена *HBD1* в сперматозоидах достоверно снижена в исследуемых группах мужчин с бесплодием в сравнении со здоровыми донорами (рисунок 6, А): в 3 раза в группе 2 ($p < 0,01$,

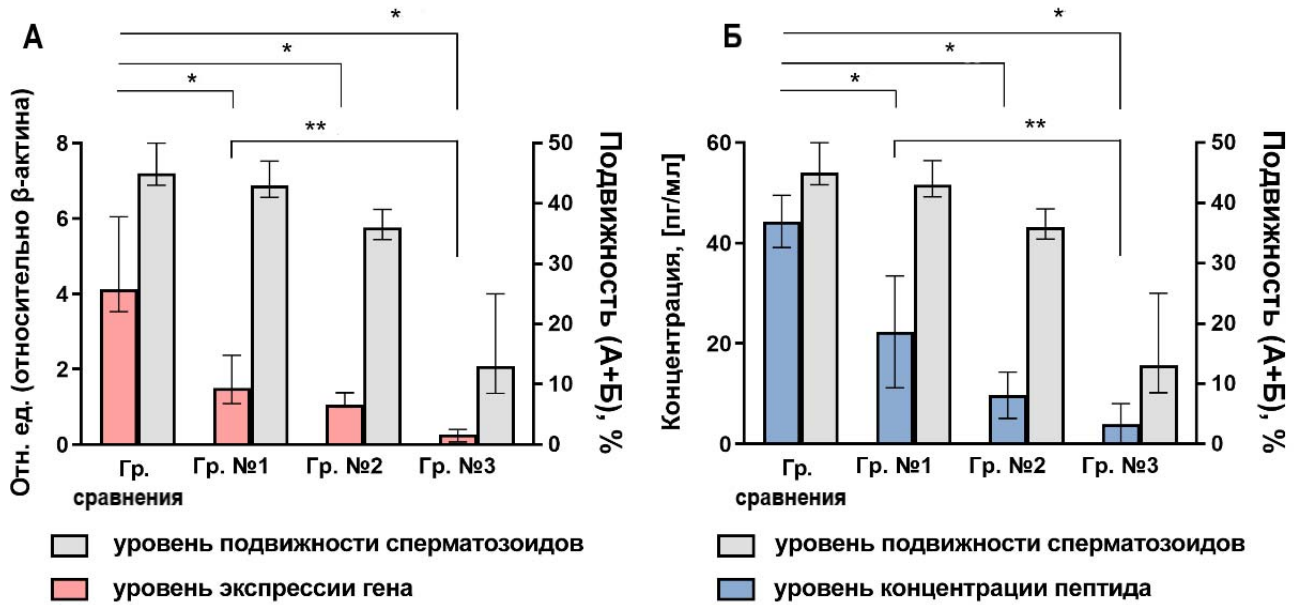
здесь и далее: достоверность различий оценивалась с применением теста ANOVA) и в 4 раза в группе 3 ($p < 0,001$). В группе пациентов 1 наблюдалась тенденция к снижению экспрессии гена *HBD1* в 2,2 раза ($p = 0,06$) в сравнении с группой здоровых мужчин.

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 первой группе пациентов ($p < 0,05$), в 1,5 раза во второй группе ($p < 0,01$) и в третьей группе в 2,3 раза ($p < 0,001$) в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 6, Б).

Была обнаружена зависимость снижения концентрации HBD1 в семенной жидкости пациентов с бесплодием от степени выраженности АЗС. Значение коэффициента корреляции Спирмена составило $R = 0,74$, $p < 0,05$, что соответствует высокой степени связи между уровнем концентрации HBD1 и подвижностью сперматозоидов.

Далее нами были оценены уровни экспрессии гена и концентрации пептида HBD126 в семенной жидкости пациентов (рисунок 7 А, Б).

Достоверное снижение экспрессии гена *HBD126* также было выявлено во всех исследуемых группах: в группе 1 в 3 раза ($p < 0,01$, сравнение исследуемых групп проводили с применением критерия Данна), в группе 2 в 4 раза ($p < 0,001$) и в группе 3 в 16 раз ($p < 0,001$) в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 7, 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 уровнем экспрессии гена *HBD126* и подвижностью сперматозоидов.



Примечания: * – статистически значимое отличие от группы сравнения, $p \leq 0,05$
 ** – статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ, $p \leq 0,05$
 Данные уровней концентрации представлены в виде Mean \pm SD.
 Данные уровней экспрессии и подвижности представлены в виде Me (Q1; Q3).
 Рисунок 7 – Экспрессия гена *HBD126* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида HBD126 в семенной жидкости (Б) у мужчин с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров

Концентрация в семенной жидкости пептида HBD126 у здоровых мужчин составила $(44,33 \pm 5,2)$ пг/мл. В первой группе пациентов наблюдалось её достоверное снижение в 2 раза ($p < 0,01$), во второй группе в 4,6 раза ($p < 0,001$), и в третьей — в 11 раз ($p < 0,001$) в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 7, Б). Концентрация HBD126 в семенной плазме мужчин с бесплодием достоверно снижалась в группах пациентов в зависимости от уровня снижения подвижности их сперматозоидов ($p < 0,001$). Так, у группы пациентов с тяжелой степенью АЗС концентрация в семенной жидкости пептида HBD126 составила $(3,95 \pm 4,13)$ пг/мл, что в 5,6 раза ниже в сравнении с пациентами с нормозооспермией ($p < 0,05$). Корреляционный анализ взаимосвязи между концентрацией HBD126 в семенной жидкости и снижением подвижности сперматозоидов у мужчин с бесплодием выявил высокий уровень связи, $R = 0,84$, $p < 0,05$.

Предполагается, что дефицит HBD1 ассоциирован с недостаточностью мужской фертильной функции. Мы продемонстрировали, что степень снижения

экспрессии гена и содержание пептида HBD1 в эякуляте коррелируют со степенью выраженности АЗС (рисунок 6 А, Б). Данный результат согласуется с уже известными литературными данными: пациенты с олигоастенозооспермией и лейкоцитоспермией имели более низкие уровни концентрации пептида HBD1 в семенной жидкости в сравнении с пациентами с нормальными параметрами спермограммы [18, 100]. Уникальным свойством дефензина HBD1 является его способность регулировать CCR6-зависимую мобилизацию ионов кальция Ca^{++} , что увеличивает подвижность сперматозоидов и их способность проникать в яйцеклетку [18]. Молекулы HBD1 связываются со сперматозоидами через хемокиновый рецептор CCR6, после чего активируется ассоциированный с ним гетеротримерный G-белок. Это активирует каскад дальнейших сигнальных событий, что в конечном итоге приводит к активации внутриклеточных вторичных мессенджеров, таких как цАМФ и кальций, существенно повышающих уровень подвижности сперматозоидов [97]. Опыты инкубации сперматозоидов с рекомбинантными β -дефензинами демонстрировали положительный эффект на поддержание их жизнеспособности и подвижности [98, 99, 100, 101]. В совокупности эти данные подтверждают важную роль β -дефензина HBD1 в регуляции подвижности сперматозоидов как основной характеристики их фертильной функции.

Аналогичный результат был получен при измерении уровней экспрессии гена *HBD126* в сперматозоидах и концентрации HBD126 в семенной жидкости бесплодных мужчин и группы фертильных доноров — и экспрессия, и концентрация снижаются тем сильнее, чем более выражена степень АЗС у пациентов исследуемых групп (рисунок 7 А, Б). В работах коллектива авторов под руководством Theodore L. Tollner обсуждается роль β -дефензина HBD126 в развитии мужского бесплодия [17, 106, 109]. Также при анализе литературных данных было обнаружено, что ген человека *HBD126* высоко полиморфен, и носительство неблагоприятных аллелей этого гена может быть ассоциировано с нарушением мужской фертильности [108]. Поэтому следующей задачей нашего исследования стал анализ известных литературных данных, определение наиболее

значимой мутации гена *HBD126* и изучение её распространенности среди мужчин московской популяции.

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

Показано, что ген человека *HBD126* является высоко полиморфным, в его структуре идентифицировано 77 SNPs [166]. Среди известных полиморфизмов гена *HBD126*, согласно анализу литературы, особое место занимает дунуклеотидная делеция во втором экзоне rs11468374. Данная мутация предположительно ассоциирована с идиопатической формой бесплодия у мужчин ввиду нарушения структуры гликокаликса сперматозоидов, способности продвигаться сквозь слой цервикальной слизи и снижения подвижности сперматозоидов. Таким образом, важной 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 белкового продукта в семенной жидкости пациентов с ИДБ и здоровых мужчин московской популяции.

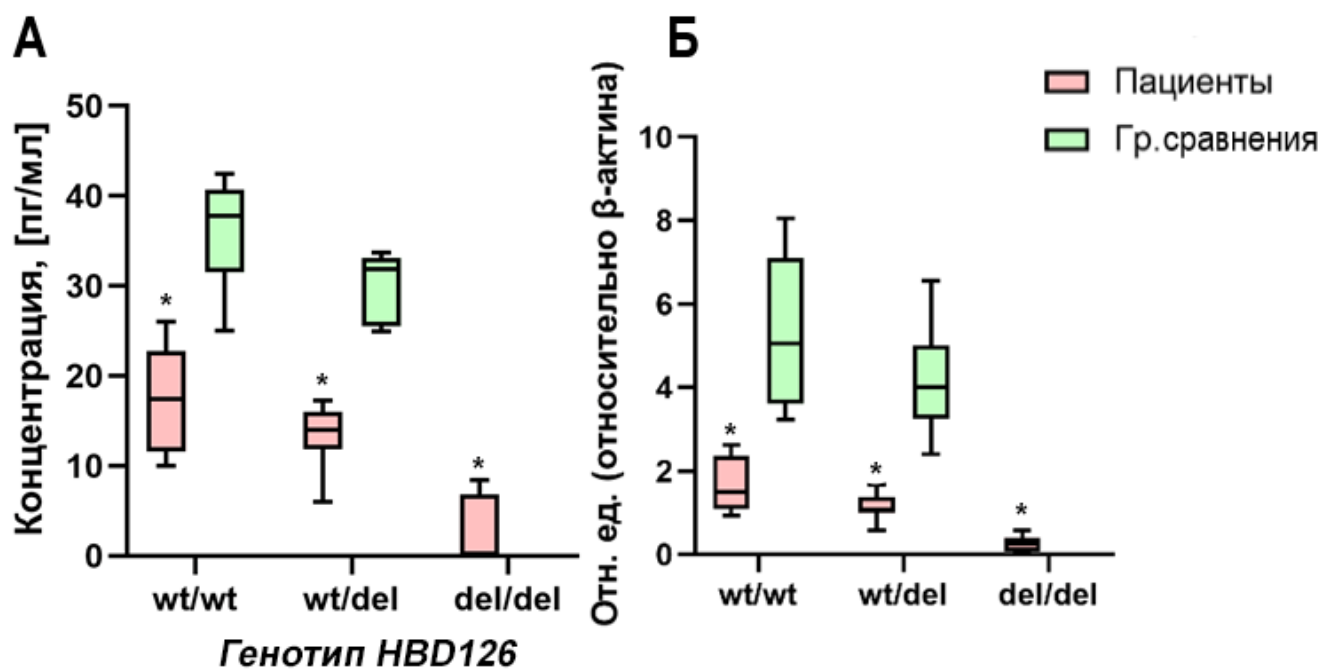
Среди обследованных мужчин с ИДБ ($n = 84$) носителями мутантного аллеля в гетерозиготном положении (генотип *HBD126 wt/del*) явились 49 мужчин, в гомозиготном положении (*HBD126 del/del*) — 15 мужчин, не выявлена мутация (*HBD126 wt/wt*) у 20 пациентов (таблица 6). Среди доноров группы сравнения ($n = 45$) мутация в гетерозиготном состоянии выявлена у 18 мужчин, генотип дикого типа был выявлен у 27 человек. Важно отметить, что неблагоприятный мутантный генотип *del/del* был обнаружен только среди мужчин с бесплодием, мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении (генотип *HBD126 del/del*) среди контрольной группы обнаружено не было.

Таблица 6 – Частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* 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
Группа сравнения	80	20	27	60	18	40	0	0

Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* среди обследуемых 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% (таблица 6). 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 с бесплодием ($\chi^2 = 16,57$; $p < 0,001$; 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 экспрессия гена *HBD126* в сперматозоидах и концентрация пептида *HBD126* в семенной жидкости в зависимости от генотипа по полиморфному маркеру rs11468374 (рисунок 8).



Примечания: * – статистически значимое отличие групп пациентов с ИДБ от доноров группы сравнения с генотипом *wt/wt*, $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде Me (Q1, Q3), min-max.

Рисунок 8 – 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.

Мы продемонстрировали, что носительство неблагоприятного аллеля *del* гена *HBD126* достоверно ассоциировано со снижением концентрации этого дефензина в семенной жидкости пациентов с генотипом *wt/del* в 2,7 раза ($p < 0,01$, здесь и далее: сравнение исследуемых групп проводили с применением непараметрического критерия Краскела-Уоллиса), и у пациентов с генотипом *del/del* в 14,7 раза ($p < 0,001$) в сравнении со здоровыми донорами эякулята, имеющих генотип *wt/wt*. Примечательно, что у пациентов, не являющихся носителями мутации, наблюдалось снижение концентрации пептида в семенной жидкости в 2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с донорами генотипа *wt/wt*. Также наблюдалась тенденция к снижению уровня концентрации пептида среди здоровых доноров с генотипом *wt/del*, разница со здоровыми донорами генотипа *wt/wt* составила 1,2 раза ($p = 0,08$).

При изучении влияния носительства мутации rs11468374 гена *HBD126* на уровень его экспрессии были получены следующие результаты (рисунок 8, Б). У

мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении (генотип *del/del*) экспрессия была снижена в 19,6 раз в сравнении со здоровыми донорами генотипа *wt/wt* ($p < 0,001$). Также было выявлено, что экспрессия в группе пациентов с генотипом *wt/del* достоверно снижена в 5 раз в сравнении с донорами с генотипом *wt/wt* ($p < 0,01$). В группе здоровых доноров с генотипом *wt/del* экспрессия гена *HBD126* снижалась в 1,3 раза в сравнении с донорами с генотипом *wt/wt*, однако без статистической достоверности ($p = 0,2$). 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 ($p < 0,01$).

Далее мы определили, как меняется степень выраженности астенозооспермии у пациентов с ИДБ в зависимости от их генотипа по полиморфному маркеру rs11468374 (таблица 7).

Таблица 7 – Распределение показателей подвижности сперматозоидов в зависимости от генотипа rs11468374 *HBD126* у пациентов с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров

Генотип \ Группа	Основная группа (А+Б), %	Контрольная группа (А+Б), %
wt/wt	41,5 ± 4,4	47 ± 4,7
wt/del	39 ± 7,6	46 ± 4,4
del/del	9 ± 5,5*	—

Примечания: * – статистически значимое отличие от группы здоровых доноров генотипа *wt/wt*, $p \leq 0,05$.

Данные представлены в виде (Mean ± SD).

(А+Б), % — суммарное процентное содержание в эякуляте сперматозоидов категорий подвижности А и Б.

Было показано, что у пациентов с генотипом *HBD126 del/del* наблюдается наиболее выраженная астенозооспермия: подвижность сперматозоидов снижена в 5,2 раза в сравнении с показателем подвижности сперматозоидов доноров контрольной группы с генотипом *HBD126 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 астенозооспермии ($\chi^2 = 9,902$; $p = 0,008$).

Присутствие двунуклеотидной делеции во втором экзоне гена *HBD126* ведет к образованию молекул β -дефензина со значительно редуцированным количеством сайтов О-гликозилирования, и, как следствие, к формированию дефектной структуры гликокаликса сперматозоидов. 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 [106]. В проведенном нами исследовании среди мужчин московской популяции частота встречаемости мутантного аллеля составила 0,47, что сопоставимо с частотой встречаемости этого аллеля в европейской популяции (таблица 6). Частота встречаемости мутантного гомозиготного генотипа *del/del* среди мужчин московской популяции в проведенной нами работе составила 0,18, такой же показатель был получен для британской и китайской популяций [106]. Во всех исследованных популяциях, в том числе и в нашей работе, распределение аллелей гена *HBD126* соответствует закону Харди-Вайнберга. Таким образом, можно сделать вывод о том, что мутация гена *HBD126* является широко распространенным полиморфизмом, генетически закрепленным 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 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. В работе P. V. Voročeni et al. сообщается, что сперматозоиды мужчин, имеющих генотип *del/del HBD126*, демонстрируют нарушение функциональной

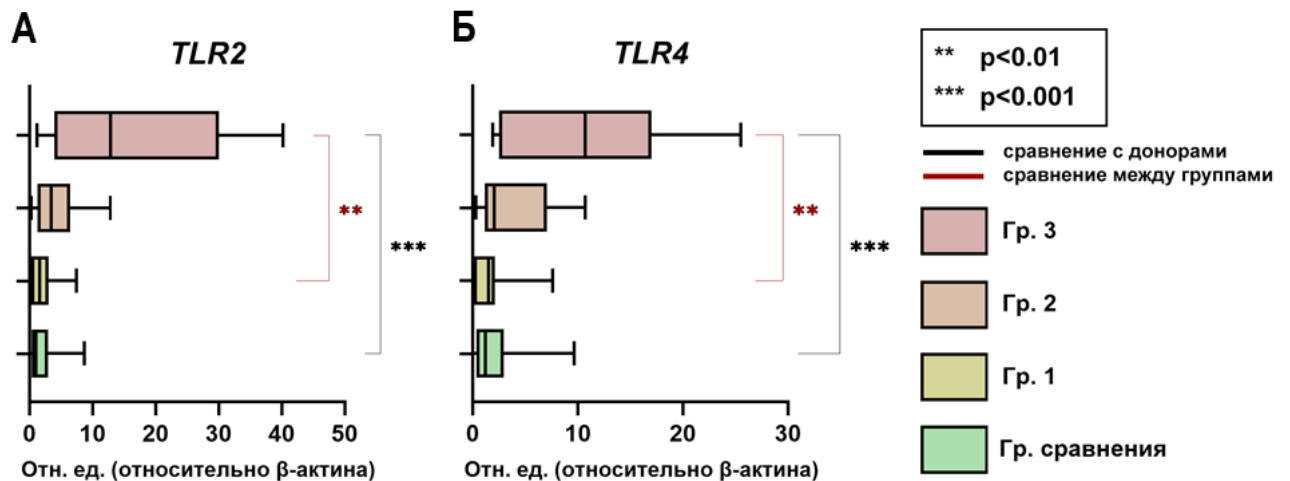
активности, и таким пациентам рекомендовано проведение вспомогательных репродуктивных технологий при планировании семьи [86].

В дополнение нами впервые была изучена ассоциация между экспрессией гена *HBD126* и его концентрацией в семенной жидкости и носительством мутантного аллеля *del*. Известно, что данный полиморфизм представляет собой делецию двух нуклеотидов во втором экзоне, и результатом этой мутации является сдвиг рамки считывания и образование мРНК, лишенной стоп-кодона [113, 115]. При исследовании других генов, несущих мутации, при которых отсутствует стоп-кодон внутри рамки считывания, было показано, что экспрессия мРНК в случае носительства мутации достоверно снижается в сравнении с уровнем соответствующей нормальной мРНК [116, 117].

Мы показали, что экспрессия гена *HBD126* в группе мужчин с генотипом *DEFB126 del/del* достоверно снижена в 12,3 раза в сравнении с донорами контрольной группы с генотипом *DEFB126 wt/wt* (рисунок 8). Однако примечательно, что у пациентов с бесплодием, имеющих генотип *DEFB126 wt/wt*, также наблюдалось снижение как экспрессии гена в сперматозоидах, так и концентрации пептида HBD126 в семенной жидкости. Возможным объяснением может являться тот факт, что в структуре гена *DEFB126* всего выявлено 77 возможных полиморфизмов. В работе Subhash Solanki и соавт. по изучению влияния полиморфных вариантов гена *BBD129*, являющегося бычьим аналогом человеческого *DEFB126*, на фертильность крупного рогатого скота, было высказано предположение, что носительство различных полиморфных аллелей гена *BBD129* отрицательно влияло на конформацию и стабильность дефензина, что приводило к снижению или полному отсутствию его функциональной активности [166]. В нашей работе проведен анализ только одного полиморфного варианта гена *DEFB126* (rs11468374), и таким образом, причиной снижения экспрессии гена и концентрации HBD126 в семенной жидкости бесплодных пациентов с генотипом *DEFB126 wt/wt* потенциально может являться носительство других мутантных аллелей гена, что требует дальнейшего изучения.

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

Поскольку на поверхности сперматозоидов экспрессированы функционально активные рецепторы TLR2 и TLR4, нами были исследованы уровни их мРНК в сперматозоидах [10, 131]. Данные рецепторы распознают широкий спектр PAMP и DAMP. В частности, TLR2 активируется в ответ на связывание белков теплового шока HSP70 и HSP90, а TLR4 — при связывании HSP60 и HSP70.



Примечания: ** – статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ, $p < 0,01$; *** статистически значимое отличие от группы сравнения, $p < 0,001$. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3), min-max.

Рисунок 9 – Экспрессия гена *TLR2* (А) и *TLR4* (Б) в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием и доноров группы сравнения.

Наибольшая разница между уровнями экспрессии гена *TLR2* была показана для пациентов группы 3 и доноров группы сравнения, она составила повышение в 12 раз ($p < 0,001$ здесь и далее: сравнение исследуемых групп проводили с использованием критерия Данна) (рисунок 9, А). Уровень экспрессии *TLR2* в сперматозоидах мужчин с умеренной степенью АЗС (гр.2) был повышен в 3 раза в сравнении с группой контроля, однако без статистической достоверности

($p = 0,08$). Была также продемонстрирована разница между группами мужчин с бесплодием: экспрессия *TLR2* была выше в гр. 3 в сравнении с пациентами гр. 1 в 8,3 раза ($p < 0,01$).

Исследование экспрессии гена *TLR4* выявило следующие результаты (рисунок 9, Б). Наиболее выраженная гиперэкспрессия наблюдалась среди мужчин группы 3 в сравнении со здоровыми донорами эякулята, повышение составило 8,7 раза ($p < 0,001$). Достоверных отличий в экспрессии гена *TLR4* у пациентов групп 2 и 1 в сравнении со здоровыми мужчинами обнаружено не было. Также наблюдалось выраженное повышение уровня экспрессии *TLR4* в группы 3 в сравнении с группой 1 в 7 раз ($p < 0,01$).

Далее нами был проведен корреляционный анализ между показателями подвижности сперматозоидов исследуемых групп бесплодных мужчин и уровнями экспрессии генов рецепторов *TLR2* и *TLR4*. Коэффициент корреляции для экспрессии гена *TLR2* в сперматозоидах мужчин группы 3 и подвижности сперматозоидов в эякуляте составил $R = -0,56$, $p < 0,05$, что соответствует заметной силе связи. Корреляция между экспрессией гена *TLR4* в сперматозоидах пациентов группы 3 и подвижности также соответствует заметной обратной силе связи: $R = -0,501$, $p < 0,05$.

Суммируя полученные данные, можно предположить, что повышенная активация мембранных рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4* ассоциирована с развитием идиопатической астенозооспермии. Связь между индукцией *TLR2/4* и ухудшением фертильности сперматозоидов была продемонстрирована в работе Youko 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 человека и мыши, и снижение частоты успешного оплодотворения яйцеклетки сперматозоидами мыши как *in vivo*, так и *in vitro* [10]. О факте негативного влияния aberrантной экспрессии генов рецепторов *TLR2/4* в сперматозоидах на их фертильную функцию сообщается так же в исследовании N. Sereshki и соавторов [167].

Кроме того, на сегодняшний день известен более детально изучен каскад активации TLR2/4 в сперматозоидах, имеющий свои специфические особенности. Было показано, что при действии на сперматозоиды человека и мыши агонистами TLR2 и TLR4 — зимозаном и ЛПС — наблюдается снижение мембранного потенциала митохондрий и уровня АТФ в клетках в результате активации MyD88-PI3K-GSK3 α -зависимого пути, и такие сперматозоиды демонстрируют значительное снижение уровня подвижности [135]. Обработка сперматозоидов агонистами TLR стимулирует активность PI3K, а блокада передачи сигналов от PI3K с помощью ингибиторов или методов нокаута гена восстанавливает вызванное агонистами TLR снижение подвижности сперматозоидов. Нарушение подвижности сперматозоидов и снижение уровня АТФ были отмечены у мышей с нокаутом гена GSK3 α , что указывает на связь между GSK3 α и митохондриальным метаболизмом [139]. Было показано, что ингибирование передачи сигналов от GSK3 α обращало вспять снижение подвижности сперматозоидов, вызванного активацией TLR.

Таким образом, передача сигналов от TLR регулирует подвижность сперматозоидов и уровни АТФ в митохондриях посредством пути, включающего стимуляцию киназ PI3K и GSK3 α . Эти процессы не зависят от классического пути активации транскрипционного фактора NF- κ B, существующего в соматических клетках и описанного выше, однако дают представление о патогенезе идиопатического снижения мужской фертильной функции, вызванного активацией TLR сперматозоидов.

3.2.4 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 уровни экспрессии генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и концентрация белка HSP70 в семенной жидкости бесплодных мужчин и доноров группы сравнения.

Полученные данные по экспрессии генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Экспрессия генов *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием и доноров группы сравнения

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

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

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

Данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

Было обнаружено, что уровень экспрессии гена *HSP60* среди пациентов с нормальными показателями спермограммы (группы 1) и здоровыми донорами эякулята был сопоставим. Экспрессия гена *HSP60* у пациентов группы 3 была достоверно снижена в 3,3 раза по сравнению с группой фертильных доноров ($p < 0,01$). У пациентов со средней степенью тяжести АЗС (группа 2) уровень экспрессии гена *HSP60* оказался ниже, чем у доноров группы сравнения, в 2,7 раза ($p = 0,01$).

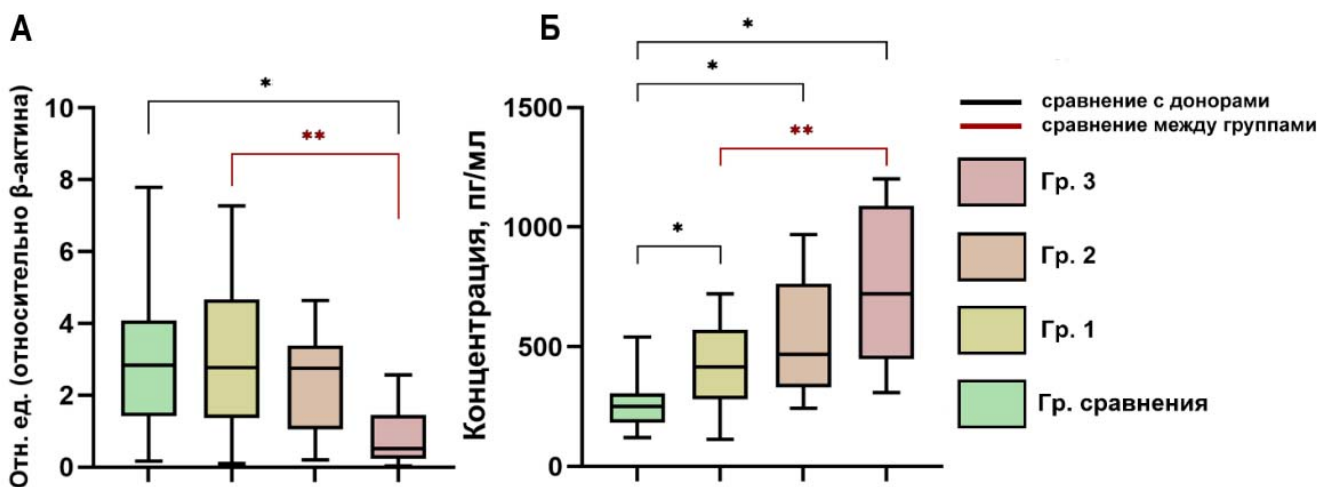
Также обнаружено значимое отличие в уровнях экспрессии *HSP60* между группами пациентов ($p < 0,001$ по критерию Краскела-Уоллиса). В сравнении с группой 1 экспрессия гена *HSP60* достоверно снижена в 4 раза в группе пациентов 3 ($p < 0,05$). Была обнаружена заметная положительная связь между уровнем экспрессии гена *HSP60* и концентрацией сперматозоидов в эякуляте, значение коэффициента Спирмена составило $R = 0,511$ ($p < 0,05$), и умеренная связь со снижением подвижности сперматозоидов, $R = 0,309$ ($p < 0,05$).

Полученный нами результат согласуется с данными работы Werner et al., где было продемонстрировано, что низкое количество сперматозоидов, экспрессирующих *HSP60*, было ассоциировано с нарушением их сперматогенной функции и развитием бесплодия [160]. Кроме того, *HSP60* участвует в процессе приобретения сперматозоидами способности к оплодотворению, что также может объяснять снижение экспрессии его гена у пациентов с ИДБ и его нормальный уровень у фертильных доноров.

Белок теплового шока *HSP90* был обнаружен в клетках гонад млекопитающих, где он выполняет важные функции в обеспечении и поддержании фертильности, а также на клеточной поверхности сперматозоидов. *HSP90* регулирует деление половых клеток и участвует в сперматогенезе, формировании цитоскелета сперматозоидов, необходим для формирования функционально полноценных форм рецепторов стероидных гормонов [146, 154, 155].

При анализе экспрессии гена *HSP90* было выявлено достоверное снижение её уровня у пациентов с ИДБ группы 3 в 7 раз по сравнению с группой здоровых мужчин ($p < 0,01$). У пациентов со средней степенью тяжести АЗС (гр. 2) наблюдалось снижение экспрессии гена *HSP90* в 4 раза относительно здоровых доноров ($p = 0,05$). Показана значимая разница в уровнях экспрессии между группами бесплодных пациентов ($p < 0,01$ по критерию Краскела-Уоллиса). Полученные нами данные совпадают с исследованиями, продемонстрировавшими значительные изменения в локализации и экспрессии *HSP90* в сперматозоидах пациентов с олигоастенозооспермией [157, 158].

В работах ряда авторов сообщается, что дефицит HSP70 приводит к недостаточности функционирования синаптонемного комплекса и остановке сперматогенеза в профазе I мейоза и, как следствие, к снижению фертильной функции [149, 151, 152]. В то же время этот белок является эндогенным сигналом опасности DAMP и лигандом для рецепторов TLR2 и TLR4, экспрессируется множеством клеток организма при действии факторов стресса, и определяется в семенной жидкости мужчин [128]. Таким образом, внутриклеточный HSP70 играет важную роль в развитии сперматозоидов, а его внеклеточная форма, обнаруживаемая в семенной жидкости, в избытке способна привести к гиперактивации Toll-подобных рецепторов 2 и 4 сперматозоидов и ухудшению их фертильных свойств. В связи с этим нами были изучены уровни экспрессии гена и концентрации белка теплового шока HSP70 в семенной жидкости у мужчин с ИДБ и группы фертильных доноров (рисунок 10).



Примечания: * – статистически значимое отличие от группы сравнения, $p \leq 0,05$; ** – статистически значимое отличие между группами пациентов с ИДБ, $p \leq 0,05$.
Рисунок 10 – Экспрессия гена *HSP70* в сперматозоидах (А) и концентрация пептида HSP70 в семенной жидкости (Б) мужчин с идиопатическим бесплодием и здоровых доноров.

Уровни экспрессии гена *HSP70* у пациентов групп 1, 2 и здоровых доноров были сопоставимы. Было показано, что в группе мужчин с тяжелой степенью тяжести АЗС (гр. 3) уровень экспрессии *HSP70* снижен в 5,6 раза ($p < 0,01$) в

сравнении со здоровыми мужчинами (рисунок 10, А). В группе 3 показано снижение экспрессии *HSP70* в 5,5 раза в сравнении с пациентами группы 1 ($p < 0,01$).

Результат измерения концентрации в семенной жидкости белка *HSP70* представлен на рисунке 10, Б. Согласно полученным данным, содержание *HSP70* в семенной жидкости пациентов с тяжелой степенью АЗС (группа 3) составило $(740,8 \pm 315,4)$ пг/мл, что превышало таковой показатель группы здоровых доноров в 3 раза ($p < 0,001$). В сравнении со здоровыми мужчинами также наблюдалось повышение концентрации в 1,6 раза в группе пациентов 1 ($p < 0,05$) и в 2 раза в группе пациентов 2 ($p < 0,01$). Внутри групп пациентов показаны статистические отличия ($p < 0,001$). Так, концентрация *HSP70* в семенной жидкости мужчин группы 3 достоверно превышала таковой показатель группы 1 в 1,7 раза ($p < 0,001$).

Корреляционный анализ взаимосвязи уровня концентрации *HSP70* в семенной жидкости мужчин и подвижности их сперматозоидов продемонстрировал заметную отрицательную связь, значение коэффициента Спирмена составило $R = -0,609$, $p < 0,05$. Была также выявлена умеренная отрицательная корреляция между снижением концентрации сперматозоидов в эякуляте и повышением содержания *HSP70* в семенной жидкости, $R = -0,415$, $p < 0,05$.

Проведены единичные исследования взаимосвязи между экспрессией *HSP70* и бесплодием у мужчин, однако полученные данные противоречивы и требуют дальнейшего изучения вопроса. Необходимость участия *HSP70* в формировании фертильности мужских половых клеток была подчеркнута в исследовании, показавшем, что подавление экспрессии гена *HSP70* ведёт к нарушению прохождения мейоза, апоптозу зародышевых клеток и развитию бесплодия [153]. Это согласуется с полученными нами данными: группа пациентов 3, продемонстрировавшая наибольшее снижение экспрессии *HSP70*, характеризуется достоверно сниженным показателем концентрации сперматозоидов в эякуляте в сравнении с донорами фертильной группы ($p < 0,01$) (таблица 8). Также aberrантная экспрессия *HSP70* была обнаружена в незрелых

сперматозоидах человека, которые не могут завершить нормальный спермиогенез [168]. В исследовании, проведенном Huang и соавт. показано, что продукция HSP70 снижается у кабанов в жаркий сезон, и вместе с этим снижаются фертильные свойства сперматозоидов [149]. Однако в работах других авторов сообщается о повышении уровней HSP70 в ответ на тепловое воздействие с последующим нарушением сперматогенеза, снижением качества сперматозоидов и фрагментации их ДНК [150, 169].

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 возрасала. Вероятным объяснением может являться имеющееся нарушение экспрессии гена *HSP70* именно половыми клетками при нормальной или усиленной выработке пептида HSP70 эпидидимальными секреторными клетками.

Таким образом, снижение уровней экспрессии генов белков теплового шока HSP70, HSP60 и HSP90 может быть причиной развития мужского бесплодия невыясненного генеза ввиду отсутствия соответствующего диагностического подхода, позволяющего выявить, на каком уровне локализовано дефектное звено сперматогенеза.

3.2.5 Измерение концентрации провоспалительных цитокинов в семенной плазме мужчин с идиопатическим бесплодием

Семенная жидкость представляет собой гетерогенную суспензию, содержащую большое количество разнообразных биологически активных веществ, в число которых входят цитокины [12]. 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 β , IL-18, TNF в семенной жидкости мужчин с ИДБ.

Концентрация IL-1 β в семенной жидкости здоровых мужчин практически не определялась (таблица 9). При этом в семенной жидкости пациентов гр. 3 ее уровень составил 21 пг/мл, что превысило концентрацию IL-1 β в семенной жидкости пациентов группы 1 в 6 раз ($p < 0,01$ по критерию Данна). Достоверное увеличение концентрации было также обнаружено среди пациентов группы 2 и группы 3 в сравнении со здоровыми мужчинами в 9 и 19 раз, соответственно ($p < 0,01$).

Таблица 9 – Концентрация IL-1 β , 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 β	1,1 (0,3; 3,1)	3,32 (2,56; 5,8)**	10 (8,6; 12,4)*	21 (16; 26)*
	IL-18	17,4(7,7; 34,6)	27,4 (10,2; 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, $p \leq 0,01$;

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

Концентрация IL-18 в семенной жидкости пациентов группы 3 составила 278 пг/мл, что в 16 раз ($p < 0,01$) превышало показатель группы здоровых мужчин. Выявлена тенденция к повышению концентрации данного цитокина у пациентов группы 2 в 3 раза по сравнению с группой фертильных доноров ($p = 0,08$). Уровни концентрации IL-18 в семенной жидкости мужчин группы 1 и здоровых доноров достоверно не отличались. В группе пациентов с тяжелой степенью АЗС (гр. 3) разница составила 10 раз в сравнении с группой 1 ($p < 0,01$).

Далее нами были изучены уровни концентрации в семенной жидкости провоспалительного цитокина TNF у бесплодных мужчин и доноров группы сравнения. Уровень концентрации TNF в семенной жидкости пациентов группы 3 составлял 51,5 пг/мл, что превосходило этот показатель группы сравнения в 8 раз, $p < 0,01$. У пациентов с умеренной степенью АЗС (группы 2) концентрация этого цитокина увеличена в 3,3 раза ($p < 0,01$), у пациентов группы 1 — в 2 раза по сравнению с группой здоровых мужчин, однако без статистической достоверности ($p = 0,1$). Обнаружено достоверное повышение концентрации TNF в 2,4 раза в группе пациентов с тяжелой степенью АЗС в сравнении с пациентами с умеренной АЗС ($p < 0,01$).

Был проведен корреляционный анализ для оценки связи между концентрацией в семенной жидкости исследуемых цитокинов и фертильными параметрами сперматозоидов мужчин (таблица 10). Сильный уровень связи по коэффициенту Спирмена ($p < 0,05$) был выявлен при оценке взаимосвязи следующих признаков: концентрации в семенной жидкости IL-1 β и подвижности и количеством сперматозоидов в эякуляте; концентрации IL-18 и подвижности; концентрации TNF и подвижности.

Таблица 10 – Корреляция уровня концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-18, TNF в семенной жидкости с показателями фертильности сперматозоидов

Корреляционный анализ, признак	Подвижность сперматозоидов	Количество сперматозоидов	Характеристика связи
Концентрация IL-1 β	R = -0,861*	R = -0,721*	Сильная; Сильная
Концентрация IL-18	R = -0,807*	R = -0,509*	Сильная; Заметная
Концентрация TNF	R = -0,761*	R = -0,549*	Сильная; Заметная

Примечание: * - при уровне статистической значимости $p \leq 0,05$

Исследования уровней и репертуара цитокинов в семенной плазме у пациентов с бесплодием демонстрируют повышение концентрации IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF, G-CSF и M-CSF [69]. Некоторые авторы также отмечают отрицательную корреляцию между уровнями провоспалительных цитокинов в семенной плазме и функциональными параметрами сперматозоидов — подвижностью, концентрацией и морфологией [70, 72, 170]. Цитокины IL-1 β и TNF способны стимулировать перекисное окисление сперматозоидов за счет образования активных форм кислорода, а воздействие на сперматозоиды TNF в высоких концентрациях ведет к значительной потере целостности их генетического материала, утрате функций и индукции апоптоза [71].

В работе А. Н. Al-Marzoqi et al. были получены сходные результаты при измерении концентрации цитокинов IL-1 β , IL-18 и TNF в семенной жидкости бесплодных пациентов. Для доноров с нормозооспермией средние значения концентрации составили: IL-1 β - 24,11, IL-18 - 327,5 и для TNF — 7,05 пг/мл, а для пациентов с олигозооспермией - IL-1 β – 48,25, IL-18 - 584,6 и для TNF – 35,73 пг/мл. Авторы так же отмечают, что была обнаружена значительная положительная корреляция между уровнями TNF и IL-18 в семенной жидкости бесплодных пациентов [171]. 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.

Важность роли цитокинов в протекании нормальных процессов репродуктивной физиологии млекопитающих не вызывает сомнений. Однако в то же время вопрос целесообразности определения цитокинов в семенной жидкости для диагностики мужского бесплодия и фертильной функции сперматозоидов остается дискуссионным. Ранее считалось, дисбаланс цитокинов в эякуляте отражает не эффективность сперматогенеза, а наличие инфекционно-воспалительного процесса мужского репродуктивного тракта, и из этого следовало, что оценка цитокинов в семенной плазме не информативна при диагностике бесплодия неинфекционного генеза. Однако в последние годы становится все более

очевидным, что нарушение мужской фертильной функции различного генеза сопровождается значительным изменением баланса цитокинов в семенной плазме, что в свою очередь негативно влияет на фертильные свойства сперматозоидов и способствует поддержанию патологического процесса. 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.

3.3 Анализ факторов врождённого иммунитета в эякуляте пациентов с варикоцеле

Варикоцеле представляет одну из наиболее распространенных патологий мужской репродуктивной системы, ведущих к развитию бесплодия. Частота встречаемости варикоцеле по данным различных авторов достигает 10–30%, а возникающие на этом фоне отклонения от нормы в параметрах спермограммы наблюдаются у более чем 40% больных, что объясняет актуальность исследования сопутствующих патофизиологических механизмов [172, 173]. Поскольку компоненты врождённого иммунитета вовлечены в поддержание и формирование фертильных свойств сперматозоидов, перед нами стояла задача оценить изменения в системе врождённого иммунитета и её вклад в патогенез нарушения мужской фертильной функции при варикоцеле.

Для выполнения поставленной задачи нами был разработан и применен комплексный подход к оценке факторов ВИ в эякуляте пациентов с варикоцеле, включивший:

1. Исследование экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах пациентов с варикоцеле и измерение концентрации в семенной жидкости белка *HSP70*;
2. Анализ экспрессии генов распознающих рецепторов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах;

3. Определение в семенной жидкости концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-18 и TNF.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11 – 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	HSP70	224 (148; 268)	572 (420; 720)**
	IL-1 β	1,1 (0,3; 3)	8,7 (6,3; 17)**
	IL-18	17,4 (8; 34,6)	142 (90; 231)**
	TNF	6,2 (5; 9,7)	41 (35,4; 48)***

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

*- при уровне статистической значимости 0,05; ** - при уровне статистической значимости 0,01; *** - при уровне статистической значимости 0,001.

Достоверное увеличение экспрессии генов всех трех БТШ было выявлено в группе пациентов с варикоцеле (таблица 11). Так, в сравнении с группой здоровых доноров экспрессия гена *HSP60* в сперматозоидах увеличена в 3 раза ($p < 0,05$), гена *HSP70* — в 2 раза ($p < 0,05$), и гена *HSP90* — в 3,4 раза ($p < 0,05$). Выбор данных белков теплового шока обусловлен тем, что их продукция имеет как конститутивный, так и индуцибельный характер. Индуцированное стрессом повышение продукции клеткой белков теплового шока является механизмом гомеостаза, направленным на восстановление баланса между синтезом и

деградацией белка. При варикоцеле в роли стрессорного фактора выступает локальное повышение температуры в результате варикозного расширения вен семенников [20].

Также мы исследовали уровень концентрации белка HSP70 в семенной жидкости пациентов с варикоцеле. В сравнении со здоровыми мужчинами концентрация белка HSP70 в семенной жидкости пациентов с варикоцеле была повышена в 2,5 раза ($p < 0,01$) (таблица 11). Корреляционный анализ взаимосвязи между повышением концентрации HSP70 в семенной жидкости и снижением подвижности сперматозоидов в эякуляте выявил сильную отрицательную корреляцию ($R = -0,86$; $p < 0,01$).

Поскольку исследуемые нами БТШ являются сигналами опасности и эндогенными лигандами Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4, далее мы оценивали экспрессию их генов в сперматозоидах мужчин с варикоцеле. Распознавание Toll-подобными рецепторами их эндогенных лигандов ведет к передаче активационного сигнала в ядро и модуляции клеточного ответа на воздействие фактора стресса и, как следствие, развитию стерильного воспаления.

Нами было показано достоверное увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах мужчин с варикоцеле в 3,6 раза ($p < 0,01$) и в 12,5 раза ($p < 0,001$), соответственно, в сравнении с группой здоровых доноров.

Далее мы оценивали концентрацию провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β и IL-18 в семенной жидкости пациентов с варикоцеле (таблица 11). При анализе концентрации этих цитокинов в семенной жидкости было получено увеличение уровня TNF в 7 раз ($p < 0,001$), уровня IL-1 β в 10,2 раза ($p < 0,01$), уровня IL-18 в 7 раз ($p < 0,01$) у пациентов с варикоцеле в сравнении с донорами здоровой группы.

На следующем этапе работы мы провели корреляционный анализ выявленных изменений в системе ВИ и имеющих отклонений в параметрах спермограмм у пациентов с варикоцеле. В таблице 12 представлены молекулярно-генетические и функциональные характеристики сперматозоидов мужчин исследуемых групп — показатель подвижности сперматозоидов (%) и их количество в эякуляте (млн/мл).

Таблица 12 – Изменение уровня концентрации HSP70, провоспалительных цитокинов и показателей спермограммы

Параметр	Группа пациентов с варикоцеле	Группа сравнения	P-value
Подвижность сперматозоидов, %	35 (20; 41)	49 (45; 50)	$p < 0,05$
Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6$ /мл	56 (27; 86)	138 (79,5; 305)	$p < 0,01$
Концентрация HSP70, пг/мл	572 (420; 720)**	224 (148; 268)	$p < 0,01$ $R = -0,44^1$
Концентрация IL-1 β , пг/мл	8,7 (6,3; 17)**	1,1 (0,3; 3)	$p < 0,05$ $R = -0,68^1$
Концентрация IL-18, пг/мл	142 (90; 231)**	17,4 (8; 34,6)	$p < 0,05$ $R = -0,81^1$
Концентрация TNF, пг/мл	41 (35,4; 48)***	6,2 (5; 9,7)	$p < 0,01$ $R = -0,53^2$

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

** - при уровне статистической значимости 0,01; *** - при уровне статистической значимости 0,001.

1 – корреляция с уровнем подвижности сперматозоидов в эякуляте; 2 – корреляция с количеством сперматозоидов в эякуляте.

Показатель подвижности доноров здоровой группы находился в пределах нормы и составлял 43–50%. Подвижность сперматозоидов группы пациентов с варикоцеле составляла 27–39%, что достоверно отличается от уровня подвижности сперматозоидов здоровой группы и соответствует АЗС средней степени тяжести. Количество сперматозоидов в эякуляте пациентов с варикоцеле также достоверно снижено в сравнении с этим показателем в группе сравнения, разница составила 2,2 раза ($p < 0,05$).

При проведении корреляционного анализа была выявлена умеренная отрицательная связь между уровнем концентрации HSP70 в семенной жидкости и подвижностью сперматозоидов ($R = -0,44$; $p < 0,01$); умеренная отрицательная связь между концентрацией TNF в семенной жидкости и количеством сперматозоидов в эякуляте ($R = -0,53$; $p < 0,01$); заметная отрицательная связь

между концентрацией IL-1 β в семенной жидкости и подвижностью сперматозоидов в эякуляте ($R = -0,68$; $p < 0,05$); и сильная отрицательная корреляция при анализе связи концентрации IL-18 в семенной жидкости и подвижностью сперматозоидов ($R = -0,81$; $p < 0,05$).

В патогенезе варикоцеле выделяют следующие ключевые этапы: варикозное расширение вен гроздевидного сплетения, нарушение кровотока, локальное повышение температуры в семенниках и изменение условий, необходимых для протекания сперматогенеза, а также активация митохондриального пути апоптоза половых клеток, опосредующая снижение количества сперматозоидов в эякуляте [174]. Взаимосвязь между тепловым стрессом и снижением фертильной функции была показана в многочисленных работах зарубежных авторов, однако в нашей работе мы провели исследование влияния механизмов врожденного иммунитета на фертильные свойства сперматозоидов — их подвижность и количество в эякуляте. Нами продемонстрировано достоверное повышение экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* в сперматозоидах пациентов с варикоцеле в сравнении со здоровыми донорами эякулята. Данный результат согласуется с работой коллектива ученых во главе с Н. Nassanpour, где в экспериментальной модели хирургически индуцированного варикоцеле было также продемонстрировано ответное повышение экспрессии гена *HSP70* [175]. Однако авторы выявили снижение экспрессии гена *HSP90*, в то время как в нашем исследовании в группе мужчин с варикоцеле экспрессия *HSP90* была увеличена. Другой группой исследователей во главе с Alberto Ferlin выявлено повышение концентрации различных белков семейства теплового шока, в частности, *HSP90*, в эякуляте мужчин с варикоцеле и олигозооспермией [176].

Впервые в нашем исследовании было проведено изучение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах пациентов с варикоцеле. Мы выявили, что экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* достоверно повышается у пациентов в сравнении с группой здоровых доноров эякулята. Поскольку известно, что стимуляция TLR как эндогенными, так и экзогенными лигандами ведет к активации единичных

внутриклеточных сигнальных каскадов, мы можем утверждать, что повышение концентрации белков теплового шока в семенной жидкости пациентов с варикоцеле ведет к гиперактивации TLR2 и TLR4 и снижению подвижности клеток эякулята [135].

При варикоцеле наблюдается развитие стерильного воспаления, и активация TLR клеток мужского репродуктивного тракта и лейкоцитов ведет к продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , TNF и IL-18, и повышению их концентрации в семенной жидкости. Нами показано, что в семенной жидкости пациенток с варикоцеле концентрация обозначенных цитокинов достоверно повышена в сравнении с донорами здоровой группы. Группа исследователей M. Zeinali и соавт. также обнаружили, что в семенной жидкости пациентов с варикоцеле повышается содержание IL-18 [177]. Другим коллективом авторов во главе с M. Huleihel показано, что сами сперматозоиды способны продуцировать и вырабатывать IL-1, и предположили, что данный цитокин может оказывать влияние на физиологические функции сперматозоидов и регуляцию сперматогенеза как аутокринным, так и паракринным путем [68].

Данные о влиянии TNF на фертильную функцию сперматозоидов на сегодняшний день противоречивы. В исследовании Anna Perdichizzi и соавт., было показано, что при инкубации сперматозоидов в возрастающих концентрациях TNF подвижность и количество сперматозоидов снижались в дозо- и времязависимой манере [72]. Нами было обнаружено увеличение концентрации TNF в эякуляте пациентов с варикоцеле, что коррелировало со снижением количества их сперматозоидов. Так, у пациентов с варикоцеле, демонстрирующих повышение концентрации TNF в семенной жидкости, развитие олигозооспермии может быть объяснено проапоптотическим действием данного цитокина на сперматозоиды. Схожие результаты были получены в работе коллектива Bian J. и соавт. [178]. Однако Косак и соавт. показали, что в их работе уровни концентрации TNF отрицательно коррелировали с подвижностью и морфологией сперматозоидов, но связи с количеством сперматозоидов в эякуляте обнаружено не было [179]. Таким

образом, вопрос о влиянии TNF на функциональные параметры сперматозоидов остается дискуссионным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время мужское бесплодие является глобальной медико-социальной проблемой, и существует очевидная необходимость её всестороннего изучения и поиска маркёров, ассоциированных с нарушением фертильных свойств сперматозоидов. Тенденция к росту встречаемости «мужского» фактора бесплодия наблюдается во всем мире: по данным метаанализа Н. Levine и соавт. за период 1973–2011 гг. наблюдалось ухудшение параметров спермограмм мужчин разных стран на 50–60% [180].

В России за последние 2 десятилетия также зарегистрировано увеличение числа мужчин с бесплодием в 2,1 раза [1]. Кроме того, ухудшение параметров эякулята наблюдается у мужчин всё более молодого возраста, что связывают с увеличением воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды и возрастанием уровня стресса современного жителя [181].

Известно, что компоненты системы ВИ в органах и эякуляте выполняют 2 важные функции. Во-первых, как первая линия защиты организма, они должны обеспечить быструю и эффективную элиминацию патогенов до индукции адаптивного ответа, чтобы избежать развития возможной аутоиммунной реакции на антигены сперматозоидов. Во-вторых, они выполняют свои специфические функции в процессах сперматогенеза и репродукции на всех этапах жизненного цикла сперматозоидов. Кроме того, при избыточной активации в ответ на действие факторов стресса механизмы врождённого иммунитета опосредуют развитие воспаления. Воспалительное микроокружение негативно влияет на сперматозоиды и их функции. Таким образом, факторы ВИ становятся звеньями патогенеза бесплодия.

На сегодняшний день проблема ИДБ является важной медико-социальной проблемой для мирового здравоохранения, поскольку более, чем в половине случаев бесплодия не удается выявить этиологический фактор и назначить соответствующие методы коррекции. Рутинное исследование эякулята в рамках спермограммы не позволяет установить причину нарушения фертильности

сперматозоидов на генетическом или биохимическом уровне, и таким образом, не позволяет установить причину бесплодия неустановленного генеза. К тому же, на сегодняшний день в современной научной литературе нет работ, посвящённых комплексному исследованию факторов ВИ в эякуляте человека. Существуют отдельные исследования по изучению роли факторов ВИ в процессах репродукции в норме и при патологии, однако эти данные имеют разрозненный и нередко противоречивый характер [7, 8, 10, 11, 21, 182].

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение особенностей факторов ВИ у мужчин с бесплодием. В качестве материала для неинвазивной диагностики нарушения мужской репродуктивной функции нами были использованы образцы эякулята мужчин с ИДБ, разделенные на фракции сперматозоидов и семенной жидкости. Для достижения цели нами был разработан комплексный подход, который включил в себя следующие этапы:

1. Оценку экспрессии генов в сперматозоидах β -дефензинов *HBD1* и *HBD126* и определение их концентрации в семенной жидкости;
2. Выявление носительства мутантного аллеля полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* среди мужчин с ИДБ московской популяции;
3. Определение уровней экспрессии генов распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4*;
4. Исследование экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* в сперматозоидах и определение содержания *HSP70* в семенной жидкости;
5. Анализ концентрации цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18 в семенной жидкости;
6. Проведение корреляционного анализа между выявленными изменениями в системе ВИ и изменением функциональных параметров сперматозоидов, выраженных в спермограммах пациентов.

В исследование было включено 84 пациента с ИДБ (возраст 24-45 лет) и 45 фертильных доноров эякулята.

С использованием разработанного подхода у мужчин с бесплодием была продемонстрирована зависимость между снижением фертильного потенциала

сперматозоидов и выявленными нарушениями со стороны системы врождённого иммунитета.

Важным этапом нашего исследования являлась оценка роли и функции пептидов семейства β -дефензинов HBD1 и HBD126, широко вовлеченных в становление фертильности сперматозоидов и формирующих первую линию антимикробной защиты. Оба пептида являются структурными компонентами гликокаликса сперматозоидов и защищают их от агрессии со стороны окружающей среды. Дефензин HBD1 регулирует CCR6-зависимую мобилизацию ионов кальция Ca^{++} , необходимого для обеспечения подвижности сперматозоидов [18]. Пептид HBD126 также участвует в обеспечении миграции сперматозоидов, капацитации и процессе оплодотворения яйцеклетки [106]. Мы продемонстрировали, что степень снижения экспрессии генов в сперматозоидах и содержание пептидов HBD1 и HBD126 коррелируют со степенью выраженности АЗС. Полученный результат согласуется с известными литературными данными: пациенты с олигоастенозооспермией демонстрировали более низкие уровни концентрации пептида HBD1 в семенной жидкости в сравнении с пациентами с нормозооспермией [18, 100].

В работах коллектива авторов под руководством Т. Л. Tollner было показано, что двунуклеотидная делеция во втором экзоне гена *HBD126* (rs11468374) ассоциирована с идиопатическим бесплодием у мужчин европейской и китайской популяций [106]. В связи с этой задачей нашего исследования явилось изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* у мужчин московской популяции славянского фенотипа с нарушением фертильности. Также была исследована ассоциация носительства мутантного аллеля *del* с уровнем экспрессии гена *HBD126* в сперматозоидах и концентрацией его белкового продукта в семенной жидкости.

Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *DEFB126* среди обследованных мужчин московской популяции соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга. Среди пациентов с бесплодием в сравнении с группой здоровых доноров частота

встречаемости мутантного аллеля *del* в популяции возрастала в 2,3 раза (таблица 6). Достоверное увеличение частоты носительства мутантного аллеля *del* в основной группе пациентов свидетельствует об ассоциации данного аллеля с повышенным риском развития бесплодия [183]. Среди мужчин с бесплодием московской популяции частота встречаемости мутантного аллеля составила 0,47, что сопоставимо с частотой встречаемости этого аллеля в европейской популяции [106, 184].

Мы впервые показали, что носительство аллеля *del* достоверно ассоциировано со снижением концентрации этого дефензина 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, имеющих генотип *wt/wt* ($p < 0,01$). При изучении влияния носительства мутации rs11468374 гена *HBD126* на уровень его экспрессии было обнаружено, что у мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении экспрессия была снижена в 19,6 раз в сравнении со здоровыми донорами генотипа *wt/wt* ($p < 0,001$).

У пациентов с генотипом *DEFB126 del/del* наблюдается наиболее выраженная астенозооспермия: подвижность сперматозоидов снижена в 5,2 раза в сравнении с показателем подвижности фертильных доноров ($p < 0,01$). Таким образом, было продемонстрировано, что носительство неблагоприятного генотипа *DEFB126 del/del* ассоциировано со развитием идиопатической астенозооспермии ($\chi^2 = 9,902$; $p = 0,008$).

Кроме влияния β -дефензинов мы изучали вклад и других механизмов врождённого иммунитета в патогенез бесплодия у мужчин. Не менее значимую роль в формировании фертильных свойств сперматозоидов играют распознающие рецепторы семейства TLR, белки теплового шока и цитокины. Поэтому следующей задачей исследования явился анализ экспрессии генов рецепторов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах. Мы показали, что в группе мужчин с ИДБ и тяжелой степенью астенозооспермии уровень экспрессии распознающих рецепторов сперматозоидов *TLR2* и *TLR4* повышен в 12 и 8,7 раз ($p < 0,01$), соответственно, в сравнении с фертильными донорами. При этом уровни экспрессии *TLR2* и *TLR4* для пациентов

с нормозооспермией и умеренной АЗС и здоровых доноров были сопоставимы. Связь между активацией TLR2/4 и ухудшением фертильности сперматозоидов была продемонстрирована в работе Youko Fujita et al. [10].

Далее мы оценивали в сперматозоидах экспрессию генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90*, продукты которых широко вовлечены в поддержание сперматогенеза в качестве молекулярных шаперонов, и концентрацию в семенной жидкости *HSP70*, являющегося эндогенным лигандом для рецепторов TLR2 и TLR4. У пациентов с ИДБ было определено снижение уровней экспрессии генов *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* ($p < 0,05$). При этом концентрация *HSP70* в семенной жидкости у пациентов с идиопатической астенозооспермией, напротив, была достоверно повышена в сравнении с фертильными донорами ($p < 0,05$). Таким образом, наблюдалось нарушение экспрессии генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* в сперматозоидах при усиленной продукции *HSP70* клетками эпидидимиса мужчин с ИДБ. Известно, что подавление экспрессии гена *HSP70* ассоциировано со снижением их концентрации в эякуляте, что связано с недостаточностью функционирования синаптонемного комплекса и остановкой сперматогенеза [153]. Однако в нашей работе была продемонстрирована двойственность роли *HSP70* при мужском бесплодии: с одной стороны, сперматозоиды бесплодных мужчин имели низкие уровни экспрессии гена *HSP70*, что коррелировало со снижением их концентрации в эякуляте, а с другой — повышение концентрации *HSP70* в семенной жидкости опосредует гиперактивацию мембранных рецепторов сперматозоидов TLR2 и TLR4, в свою очередь ассоциированную со снижением их подвижности.

Получив данные о повышении экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* и концентрации их эндогенного лиганда *HSP70*, нами была проведена оценка содержания в семенной жидкости цитокинов IL-1 β , IL-18 и TNF. Выявленное нами повышение концентрации обозначенных провоспалительных цитокинов также является важным звеном патогенеза нарушения мужской репродуктивной функции. Многие авторы отмечают отрицательную корреляцию между уровнями

этих цитокинов в семенной плазме и функциональными параметрами сперматозоидов — подвижностью, концентрацией и морфологией [70, 71, 72].

Таким образом, на основании литературных данных и данных, полученных нами в ходе исследования, роль факторов ВИ в патогенезе мужского бесплодия можно охарактеризовать как «двойственную»: с одной стороны, они формируют первую линию защиты от патогенов, участвуют в сперматогенезе и формировании фертильности сперматозоидов. Однако при избыточной активации факторов ВИ развивается стерильное воспаление, негативно отражающееся на репродуктивной функции (рисунок 11).



Рисунок 11 – Дисбаланс факторов врождённого иммунитета при идиопатическом мужском бесплодии

Исследование механизмов ВИ в патогенезе идиопатического нарушения мужской фертильной функции может способствовать развитию и внедрению новых подходов к диагностике, профилактики и лечения данного заболевания, а также разработке новых методов ВРТ. На основании проведённого исследования разработана панель молекулярно-генетических маркеров ВИ, ассоциированных с нарушением мужской фертильной функции: TLR2, HSP70, IL-18, TNF, HBD1 и HBD126. Определение носительства полиморфного маркера rs11468374 гена *HBD126* позволяет обеспечить персонализированный подход в назначении конкретной методики ВРТ. Выявление мутантного генотипа *del/del* в сочетании с нарушением продукции белка HBD126 и снижением подвижности сперматозоидов может явиться достаточным основанием для назначения интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), поскольку этот метод доказал свою эффективность при недостаточной подвижности сперматозоидов.

Нами также был предложен подход к оценке показателей ВИ в сперматозоидах и семенной жидкости бесплодных мужчин с варикоцеле, систематизирующий выявляемые изменения, который включает:

1. Изучение экспрессии генов в сперматозоидах белков теплового шока *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* и концентрации в семенной жидкости пептида HSP70;
2. Определение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах;
3. Измерение концентрации провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18 в семенной жидкости;
4. Проведение корреляционного анализа между выявленными изменениями в системе ВИ с изменением функциональных параметров сперматозоидов.

Группу пациентов составили 38 пациентов с установленным диагнозом «варикоцеле» в возрасте 25–45 лет. Актуальность изучения сопутствующих патофизиологических механизмов при варикоцеле объясняется тем, что это наиболее распространенное заболевание мужской репродуктивной системы, ведущее к бесплодию, и возникающие на его фоне отклонения от нормы в параметрах спермограммы наблюдаются у более чем 40% больных.

Изучая механизмы ВИ в патогенезе бесплодия, вызванного варикоцеле, мы пришли к выводу, что при данной патологии врождённый иммунитет играет неоднозначную роль. При варикоцеле наблюдается локальное повышение температуры, вызванное варикозным расширением вен семенных канатиков, и сперматозоиды оказываются в условиях гипертермии [19, 20, 174]. 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 и активируют рецепторы семейства TLR согласно модели «опасность/повреждение» [142]. Активация рецепторов TLR2 и TLR4 клеток мужского репродуктивного тракта запускает развитие стерильного воспаления и выработку провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β и IL-18, которые попадают в эякулят и вносят существенный вклад в нарушение фертильности сперматозоидов.

Мы обнаружили, что в сравнении с группой здоровых доноров экспрессия генов белков теплового шока *HSP60*, *HSP70* и *HSP90* в сперматозоидах пациентов с варикоцеле увеличена более, чем в 2 раза. Концентрация белка HSP70 в семенной жидкости пациентов с варикоцеле была повышена в 2,5 раза. Далее нами было продемонстрировано увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в сперматозоидах мужчин с варикоцеле в 3,6 раз и в 12,5 раза, соответственно, относительно группы сравнения. Активированные эндогенными лигандами рецепторы TLR2 и TLR4 индуцируют выработку провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β и IL-18, увеличение концентрации которых было показано в семенной жидкости пациентов с варикоцеле более, чем в 7 раз. Повышение уровня провоспалительных цитокинов в семенной жидкости свидетельствует об активно протекающем процессе стерильного воспаления. Также выявленная нами гиперактивация ВИ коррелировала с нарушением функциональной активности сперматозоидов.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что индукция факторов ВИ при варикоцеле опосредует нарушение фертильной функции сперматозоидов, хотя их первоначальной задачей является поддержание сперматогенеза и обеспечение защиты от внедряющихся патогенов. Полученные

нами результаты подтверждаются существующими разрозненными и единичными работами иностранных авторов [72, 175, 176, 177, 178]. Однако в нашей работе был проведен комплексный анализ, систематизирующий вклад механизмов ВИ в нарушение фертильности сперматозоидов при варикоцеле. Проведённое нами исследование факторов ВИ в эякуляте мужчин при варикоцеле представляет собой новый подход к изучению патогенетических механизмов снижения репродуктивного потенциала сперматозоидов и может быть использовано для разработки новых методов коррекции варикоцеле.

Дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов врождённого иммунитета, вовлеченных в процессы нарушения репродуктивной функции мужчин, поможет уточнить иммунопатогенез бесплодия, определить новые диагностические маркеры и мишени для таргетной терапии.

ВЫВОДЫ

1. У мужчин с идиопатическим бесплодием обнаружено достоверное снижение экспрессии генов β -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 ($R = -0,560$; $R = -0,501$; $p < 0,05$ соответственно).
5. У пациентов с ИДБ обнаружено повышение концентрации цитокинов *TNF*, *IL-1 β* , *IL-18* в семенной жидкости. Высокая степень корреляции выявлена при оценке следующих признаков: концентрации в семенной жидкости *IL-1 β* и подвижности сперматозоидов ($R = -0,861$); концентрации *IL-1 β* 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 β 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗС – астенозооспермия

АСАТ – антиспермальные антитела

АПК – антигенпрезентирующие клетки

БТШ – белки теплового шока

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГТБ – гемато-тестикулярный барьер

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИДБ – идиопатическое бесплодие

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция

ЛК – клетки Лейдига

ПМП – противомикробный пептид

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – клетки Сертоли

ТМ – тестикулярные макрофаги

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

AIRE (autoimmune regulator) – аутоиммунный регулятор

TLR (toll-like receptors) – Толл-подобные рецепторы

HSP (heat shock protein) – белок теплового шока

HBD (human β -defensin) – человеческий β -дефензин

DAMP (danger-associated molecular pattern) – молекулярный паттерн, связанный с повреждением

IL (interleukin) – интерлейкин

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

SARM (sterile a-motifs and P-catenin/armadillo repeat motif) – стерильный альфа-мотиф и P-катенин/armadillo-повтор

TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) – TIR-домен-содержащий адаптер-индуцирующий интерферон- β

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene (88)) – белок 88 первичного генного ответа миелоидной дифференцировки

TSSK (testis-specific serine kinase) – сериновая киназа специфическая тестикулярной ткани

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

NLRP (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing) – нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, содержащий лейцин-богатый повтор и периновый домен

SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы / Г. С. Лебедев, Н. А. Голубев, И. А. Шадеркин, В. А. Шадеркина, О. И. Аполихин, А. В. Сивков, В. А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 4-12.
2. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Международная классификация болезней, 11-й пересмотр (МКБ-11), Женева, ВОЗ, 2018 г. // URL: <https://icd.who.int/browse11/l-m/ru> (дата обращения: 15.02.2023).
3. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys / M. N. Mascarenhas, S. R. Flaxman, T. Boerma, S. Vanderpoel, G. A. Stevens // PLoS medicine. – 2012. – Vol. 9. – № 12. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356> (дата обращения: 05.12.2021).
4. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care / J. Boivin, L. Bunting, J. A. Collins, K. G. Nygren // Human Reproduction. — 2007. — Vol. 22. — № 6. — P. 1506-1512. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046> (дата обращения: 05.12.2021).
5. Zhao, S. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity / S. Zhao // Cellular and Molecular Immunology. — 2014. — Vol. 11. — № 5. — P. 428-437. — URL: <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.38> (дата обращения: 05.12.2021).
6. Sperm success and immunity / S. Wigby, S. S. Suarez, B. P. Lazzaro, T. Pizzari, M. F. Wolfner // Current Topics in Developmental Biology. — 2019. — Vol. 135. — P. 287-313. — URL: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.002> (дата обращения: 05.12.2021).
7. In search of new paradigms for epididymal health and disease: innate immunity, inflammatory mediators, and steroid hormones / M. C. W. Avellar, C. M. Ribeiro, M. R. Dias-da-Silva, E. J. R. Silva // Andrology. — 2019. — Vol. 5. — № 5. — P. 690-702. — URL: <https://doi.org/10.1111/andr.12654> (дата обращения: 05.12.2021).

8. Hedger, M. P. Immunology of the Testis and Male Reproductive / M. P. Hedger // *Comprehensive Toxicology*. — 2010. — Vol. 11. — P. 189-230. — URL: <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-08-046884-6.01112-X> (дата обращения: 07.12.2021).

9. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility / A. Bracke, K. Peeters, U. Punjabi, D. Hoogewijs, S. Dewilde // *Reproductive BioMedicine Online*. 2018. Vol. 36. № 3. P. 327-339. URL: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.005>. Дата публикации: 27.12.2017. Режим доступа: открытый.

10. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis / Y. Fujita, T. Mihara, T. Okazaki, M. Shitanaka, R. Kushino, C. Ikeda, H. Negishi, Z. Liu, J. S. Richards, M. Shimada // *Human Reproduction (Oxford, England)*. — 2011. — Vol. 26. — № 10. — P. 2799-2806. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/der234> (дата обращения: 07.12.2021).

11. Dorin, J. R. Importance of β -defensins in sperm / J. R. Dorin, C. L. Barratt // *Molecular human reproduction*. — 2014. — Vol. 29. — № 9. — P. 821-829. — URL: <https://doi.org/10.1093/molehr/gau050> (дата обращения: 07.12.2021).

12. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men / J. A. Politch, L. Tucker, F. P. Bowman, D. J. Anderson // *Human Reproduction (Oxford, England)*. — 2007. — Vol. 22. — № 11. — P. 2928-2935. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem281> (дата обращения: 07.12.2021).

13. Fraczek, M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders / M. Fraczek, M. Kurpitz // *Journal of Reproductive Immunology*. — 2015. — Vol. 108. — P. 98-104. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001> (дата обращения: 11.12.2021).

14. Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele / A. Ferlin, E. Speltra, C. Patassini, M. A. Pati, A. Garolla, N. Caretta, C. Foresta // *The Journal of urology*. — 2010. — Vol. 183. — № 3. — P. 1248-1252. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.11.009> (дата обращения: 11.12.2021).

15. Gur, Y. Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm / Y. Gur, H. Breitbart // *Molecular and Cellular Endocrinology*. — 2008. — Vol. 282. — № 1-2 — P. 45-55. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.015>. (дата обращения: 11.12.2021).
16. Gur, Y. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes / Y. Gur, H. Breitbart // *Genes & development*. — 2006. — Vol. 20. — № 4. — P. 411-416. — URL: <https://doi.org/10.1101/gad.367606> (дата обращения: 11.12.2021).
17. Tollner, T. L. Multifunctional glycoprotein DEFB126—a curious story of defensin-clad spermatozoa / T. L. Tollner, C. L. Bevins, G. N. Cherr // *Nature Reviews Urology*. — 2012. — Vol. 9. — P. 365-375. — URL: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.109> (дата обращения: 11.12.2021).
18. Deficient human beta-defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection / R. Diao, K. L. Fok, H. Chen, M. K. Yu, [et al.] // *Science translational medicine*. — 2014. — Vol. 6. — № 249. — P. 249ra108. — URL: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009071> (дата обращения: 11.12.2021).
19. Varicocele and male infertility / C. F. S. Jensen, P. Østergren, J. M. Dupree, D. A. Ohl, J. Sønksen, M. Fode // *Nature reviews urology*. — 2017. — Vol. 14. — № 9. — P. 523-533. — URL: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.98> (дата обращения: 11.12.2021).
20. Хасанова, Е. М. Неоднозначная роль факторов врожденного иммунитета в нарушении фертильной функции у мужчин при варикоцеле / Е. М. Хасанова, Л. В. Ганковская, В. В. Греченко // *Иммунология*. — 2022. — Т. 43. — N 1. — С. 61-70.
21. Anderson, D. J. Cell-mediated immunity in infertility / D. J. Anderson, J. A. Hill // *American journal of reproductive immunology and microbiology: AJRIM*. — 1988. — Vol. 17. — № 1. — P. 22-30. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1988.tb00197.x> (дата обращения: 11.12.2021).
22. Agarwal, A. Proteomic Analyses of Human Sperm Cells: Understanding the Role of Proteins and Molecular Pathways Affecting Male Reproductive Health / A. Agarwal, M. K. P. Selvam, S. Baskaran // *International journal of molecular sciences*. —

2020. — Vol. 21. — № 5. — P. 1621. — URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21051621> (дата обращения: 11.12.2021).

23. Fijak, M. The testis in immune privilege / M. Fijak, A. Meinhardt // *Immunological reviews*. — 2006. — Vol. 213. — № 1. — P. 66-81. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2006.00438.x> (дата обращения: 11.12.2021).

24. Immunological microenvironment in the testis / N. Qu, Y. Ogawa, M. Kuramasu, K. Nagahori, K. Sakabe, M. Itoh // *Reproductive Medicine and Biology*. — 2020. — Vol. 19. — № 1. — P. 24-31. — URL: <https://doi.org/10.1002%2Frmb2.12293>. (дата обращения: 12.12.2021).

25. Kaur, G. Sertoli cells — immunological sentinels of spermatogenesis / G. Kaur, L. A. Thompson, J. M. Dufour // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. — 2014. — Vol. 30. — P. 36-44. — URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.semcdb.2014.02.011> (дата обращения: 12.12.2021).

26. Galectin-1 enhances TNF α -induced inflammatory responses in Sertoli cells through activation of MAPK signalling / T. Lei, S. Moos, F. Aslani, S. Bhushan [и др.] // *Scientific reports*. — 2018. — Vol. 8. — № 1. — P. 3741. — URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22135-w> (дата обращения: 12.12.2021).

27. Neonatal Pig Sertoli Cells Survive Xenotransplantation by Creating an Immune Modulatory Environment Involving CD4 and CD8 Regulatory T Cells / G. Kaur, K. Wright, P. Mital, T. Hibler, [et al.] // *Cell transplantation*. — 2020. — Vol. 29. — URL: <https://doi.org/10.1177/0963689720947102> (дата обращения: 12.12.2021).

28. Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma / V. Dal Secco, A. Riccioli, F. Padula, E. Ziparo, A. Filippini // *Biology of reproduction*. — 2008. — Vol. 78. — № 2. — P. 234-242. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063578> (дата обращения: 15.12.2021).

29. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis / R. Zhou, J. Wu, B. Liu, Y. Jiang, [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2019. — Vol. 76. — № 14. — P. 2681-2695. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9> (дата обращения: 15.12.2021).

30. Veräjäkörva, E. CD 99 and CD 106 (VCAM-1) in human testis / E. Veräjäkörva, M. Laato, P. Pöllänen // Asian journal of andrology. — 2002. — Vol. 4. — № 4. — P. 243-248. — URL: <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682X/4/243.htm> (дата обращения: 15.12.2021).

31. Reactions of Leydig cells and blood vessels to lymphoblastic leukemia in the rat testis / K. Jahnukainen, T. Saari, T. T. Salmi, P. Pöllänen, L. J. Pelliniemi // Leukemia. — 1995. — Vol. 5. — № 5. — P. 908-914.

32. T Lymphocytes and Testicular Immunity: A New Insight into Immune Regulation in Testes / J. Gong, Q. Zeng, D. Yu, Y. G. Duan // International journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22. — № 1. — P. 57. — URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22010057> (дата обращения: 15.12.2021).

33. Liva, S. M. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production / S. M. Liva, R. R. Voskuhl // The Journal of Immunology. — 2001. — Vol. 167. — № 4. — P. 2060-2067. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2060> (дата обращения: 15.12.2021).

34. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion / M. Fijak, E. Schneider, J. Klug, S. Bhushan, [et al.] // The Journal of Immunology. — 2011. — Vol. 186. — № 9. — P. 5162-5172. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001958> (дата обращения: 19.12.2021).

35. Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells / M. Walecki, F. Eisel, J. Klug, N. Baal [и др.] // Molecular biology of the cell. 2015. Vol. 26, № 15. P. 2845-2857. URL: <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-08-1323> (дата обращения: 19.12.2021).

36. Specific immune cell and cytokine characteristics of human testicular germ cell neoplasia / B. Klein, D. Fietz, S. Indumathy, K. L. Loveland [и др.] // Human reproduction (Oxford, England). — 2016. — Vol. 31. — № 10. — P. 2192-2202. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew211> (дата обращения: 19.12.2021).

37. Ковальчук, Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова – Москва:

ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 640 с. – ISBN 978-5-9704-2910-5. – Текст : непосредственный.

38. Immune Cell Subtypes and Their Function in the Testis / S. Bhushan, M. S. Theas, V. A. Guazzone, P. Jacobo, [et al.] // *Frontiers in immunology*. — 2020. — Vol. 11. — URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583304> (дата обращения: 19.12.2021).

39. Cretney, E. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells / E. Cretney, A. Kallies, S. L. Nutt // *Trends in immunology*. — 2013. — Vol. 34. № 2. — P. 74-80. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.11.002> (дата обращения: 19.12.2021).

40. Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis / V. A. Guazzone, S. Jarazo-Dietrich, M. S. Theas, L. Lustig // *Journal of Reproductive Immunology*. — 2009. — Vol. 81. — № 1. — P. 44-54. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.04.005> (дата обращения: 25.12.2021).

41. Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy / K. Wheeler, S. Tardif, C. Rival, B. Luu, [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2011. — Vol. 108. — № 18. — P. 7511-7516. — URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1017615108> (дата обращения: 19.12.2021).

42. CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in autoimmune orchitis: phenotypic and functional characterization / P. Jacobo, V. A. Guazzone, C. V. Pérez, L. Lustig // *American journal of reproductive Immunology*. — 2015. — Vol. 73. — № 2. — P. 109-125. — URL: <https://doi.org/10.1111/aji.12312> (дата обращения: 19.12.2021).

43. A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy / E. Kekäläinen, H. Tuovinen, J. Joensuu, M. Gylling, R. Franssila, N. Pöntynen, K. Talvensaaari, J. Perheentupa, A. Miettinen, T. P. Arstila // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. — 2007. — Vol. 178. — № 2. — P. 1208-1215. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1208> (дата обращения: 19.12.2021).

44. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men / M. B. Frungieri, R. S. Calandra, L. Lustig, V. Meineke, F. M. Köhn, H. J. Vogt, A. Mayerhofer // *Fertility and sterility*. — 2002. — Vol. 78. — № 2. — P. 298-306. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03206-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03206-5) (дата обращения: 19.12.2021).

45. Mossadegh-Keller, N. Testicular macrophages: Guardians of fertility / N. Mossadegh-Keller, M. H. Sieweke // *Cellular immunology*. — 2018. — Vol. 330. — P. 120-125. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.009> (дата обращения: 20.12.2021).

46. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function / K. Bryniarski, M. Szczepanik, K. Maresz, M. Ptak, W. Ptak // *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). — 2004. — Vol. 52. — № 1. — P. 27-35. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00178.x> (дата обращения: 20.12.2021).

47. Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages / M. Wang, M. Fijak, H. Hossain, M. Markmann, R. M. Nüsing, G. Lochnit, M. F. Hartmann, S. A. Wudy, L. Zhang, H. Gu, L. Konrad, T. Chakraborty, A. Meinhardt, S. Bhushan // *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). — 2017. — Vol. 198. — № 11. — P. 4327-4340. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700162> (дата обращения: 22.12.2021).

48. The influence of collagenase treatment on the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 by testicular macrophages / K. Bryniarski, M. Szczepanik, M. Ptak, W. Ptak // *Journal of immunological methods*. — 2005. — Vol. 301. — № 1-2. — P. 186-189. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.04.002> (дата обращения: 22.12.2021).

49. Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity / S. Bhushan, S. Tchatalbachev, Y. Lu, S. Fröhlich, M. Fijak, V. Vijayan, T. Chakraborty, A. Meinhardt // *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). — 2015. — Vol. 194. — № 11. — P. 5455-5464. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401132> (дата обращения: 24.12.2021).

50. Dendritic cells in autoimmune diseases / B. Ludewig, T. Junt, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel // *Current opinion in immunology*. — 2001. — Vol. 13. — № 6. — P. 657-662. — URL: [doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00275-8](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00275-8) (дата обращения: 24.12.2021).

51. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis / C. Rival, V. A. Guazzone, W. von Wulffen, H. Hackstein, E. Schneider, L. Lustig, A. Meinhardt, M. Fijak // *Molecular human reproduction*. — 2007. — Vol. 13. — № 12. — P. 853-861. — URL: <https://doi.org/10.1093/molehr/gam067> (дата обращения: 27.12.2021).

52. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis / D. Cui, G. Han, Y. Shang, C. Liu, L. Xia, L. Li, S. Yi // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. — 2015. — Vol. 444. — P. 29-36. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.033> (дата обращения: 28.12.2021).

53. Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision / A. S. Vickram, K. Dhama, S. Chakraborty, H. A. Samad, S. K. Latheef, K. Sharun, S. K. Khurana, A. K. R. Tiwari, P. Bhatt, V. K. W. Chaicumpa // *Vaccines (Basel)*. — 2019. — Vol. 7. — № 3. — URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/7/3/116> (дата обращения: 28.12.2021).

54. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? / M. Fijak, A. Pilatz, M. P. Hedger, N. Nicolas, S. Bhushan, V. Michel, K. S. K. Tung, H.-C. Schuppe, A. Meinhardt // *Human reproduction update*. — 2018. — Vol. 24. — № 4. — P. 416-441. — URL: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy009> (дата обращения: 30.12.2021).

55. Urogenital infection as a factor of development of male infertility / O. V. Melnyk, M. Z. Vorobets, R. V. Fafula, I. V. Kovalenko, Z.D. Vorobets // *Mikrobiol. Z.* 2023. — Vol. 25. — № 2. — P. 93-112. — URL: <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.02.093> (дата обращения: 01.03.2023).

56. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions / C. V. Pérez, C. M. Sobarzo, P. V. Jacobo, E. H. Pellizzari, S. B. Cigorraga, B. Denduchis, L. Lustig // *Biology of reproduction*. — 2012. — Vol. 87. — № 5. — P. 122. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101709> (дата обращения: 15.01.2022).

57. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis / C. Rival, M. S. Theas, V. A. Guazzone, L. Lustig // *Journal of reproductive immunology*. — 2006. — Vol. 70. — №1-2. — P. 43-58. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.10.006> (дата обращения: 15.01.2022).

58. Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis / V. A. Guazzone, S. Hollwegs, M. Mardirosian, P. Jacobo, H. Hackstein, M. Wygrecka, E. Schneider, A. Meinhardt, L. Lustig, M. Fijak // *International journal of andrology*. — 2011. — Vol. 34. — № 3. — P. 276-289. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01082.x> (дата обращения: 15.01.2022).

59. Cavallini, G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia / G. Cavallini // *Asian Journal of Andrology*. — 2006. — Vol. 8. — № 2. — P. 143-157. — URL: <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682X/8/143.htm> (дата обращения: 16.01.2022).

60. García-Baquero, R. Tratamiento empírico de la oligoastenoteratozoospermia idiopática / R. García-Baquero, C. M. Fernández-Ávila, J. L. Álvarez-Ossorio // *Actas urológicas españolas*. — 2020. — Vol. 44. — № 5. — P. 281-288. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2019.10.007> (дата обращения: 16.01.2022).

61. Chao, D. Discuss the seminal plasma antisperm antibody, and the association between semen parameters and sperm morphology / D. Chao // *Asia Pac. Tradit. Med*. — 2011. — № 7. — P. 104–105.

62. Garcia, P. C. Antisperm antibodies in infertile men and their correlation with seminal parameters / P. C. Garcia, E. M. Rubio, O. C. M. Pereira // *Reproductive medicine and biology*. — 2007. — Vol. 6. — № 1. — P. 33-38. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2007.00162.x> (дата обращения: 17.01.2022).

63. Evaluation on antisperm antibody in infertile men with oligoasthenoteratozoospermia / Y. C. Xu, L. I. Jing, W. B. Liang, W. J. Zhu // *Reprod. Contracept.* — 2014. — Vol. 25ю — № 1. — P. 49-53. — URL: <http://dx.doi.org/10.7669/j.issn.1001-7844.2014.01.0049> (дата обращения: 20.01.2022).

64. Activation of the immune system and sperm DNA fragmentation are associated with idiopathic oligoasthenoteratospermia in men with couple subfertility / F. Pelliccione, A. d'Angeli, B. Cinque, S. Falone, A. Micillo, F. Francavilla, F. Amicarelli, L. Gandini, S. Francavilla // *Fertility and sterility*. — 2011. — Vol. 95. — № 8. — 2676-9.e1-3. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.026> (дата обращения: 23.01.2022).

65. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men / J. A. Politch, L. Tucker, F. P. Bowman, D. J. Anderson // *Human reproduction (Oxford, England)*. — 2007. — Vol. 22. — № 11. — P. 2928-2935. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem281> (дата обращения: 27.01.2022).

66. Fraczek, M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders / M. Fraczek, M. Kurpisz // *Journal of reproductive immunology*. — 2015. — Vol. 108. — P. 98-104. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001> (дата обращения: 27.01.2022).

67. Хаитов, Р. М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 352 с. — ISBN 978-5-9704-0917-6 — Текст : непосредственный.

68. Production of interleukin-1-like molecules by human sperm cells / M. Huleihel, E. Lunenfeld, S. Horowitz, A. Levy, G. Potashnik, M. Glezerman // *Fertility*

and sterility. — 2000. — Vol. 73. — № 6. — P. 1132-1137. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00499-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00499-4) (дата обращения: 29.01.2022).

69. A repertoire of cytokines in human seminal plasma / M. Maegawa, M. Kamada, M. Irahara, S. Yamamoto, S. Yoshikawa, Y. Kasai, Y. Ohmoto, H. Gima, C. J. Thaler, T. Aono // *Journal of reproductive immunology*. — 2002. — Vol. 54. — №1-2. — P. 33-42. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00063-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00063-8) (дата обращения: 03.02.2022).

70. Increased IL-18 levels in seminal plasma of infertile men with genital tract infections / I. M. Matalliotakis, H. Cakmak, Y. Fragouli, A. Kourtis, A. Arici, G. Huszar // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2006. — Vol. 55. — № 6. — P. 428-433. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00380.x> (дата обращения: 04.02.2022).

71. Pro-inflammatory cytokines and microRNAs in male infertility / H. Attia, F. Finocchi, M. Orciani, M. Mehdi, I. Zidi Jrah, R. Lazzarini, G. Balercia, M. Mattioli Belmonte // *Molecular biology reports*. — 2021. — Vol. 48. — № 8. — P. 5935-5942. — URL: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06593-6> (дата обращения: 04.02.2022).

72. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis / A. Perdichizzi, F. Nicoletti, S. La Vignera, N. Barone, R. D'Agata, E. Vicari // *Journal of clinical immunology*. — 2007. — Vol. 27. — № 2. — P. 152-162. — URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-007-9071-5> (дата обращения: 07.02.2022).

73. Cytokines and the junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging new concept of regulation / M. W. M. Li, D. D. Mruk, W. M. Lee, C. Y. Cheng // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. — 2009. — Vol. 20. — № 4. — P. 329-338. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.07.007> (дата обращения: 11.02.2022).

74. Bromfield, J. J. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought / J. J. Bromfield // *Journal of assisted reproduction and genetics*. — 2014. — Vol. 31. — № 6. — P. 627-636. — URL: <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0243-y> (дата обращения: 11.02.2022).

75. Cytokines in the blood and semen of infertile patients / A. Havrylyuk, V. Chopyak, Y. Boyko, I. Kril, M. Kurpysz // *Central-European journal of immunology*. — 2015. — Vol. 40. — № 3. — P. 337-344. — URL: <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.54596> (дата обращения: 11.02.2022).

76. The relationship between immunosuppressive activity and immunoregulatory cytokines in seminal plasma: influence of sperm autoimmunity and seminal leukocytes / R. Ochsenkühn, A. E. O'Connor, J. J. Hirst, H. W. Gordon Baker, D. M. de Kretser, M. P. Hedger // *Journal of reproductive immunology*. — 2006. — Vol. 71. — № 1. — P. 57-74. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.01.002> (дата обращения: 15.02.2022).

77. Distinct expression pattern of cytokines in semen of men with genital infection and oligo-terato-asthenozoospermia / I. Matalliotakis, A. Arici, A. Goumenou, G. Koumantakis, B. Selam, G. Matalliotakis, E. Koumantakis // *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y.: 1989). — 2002. — Vol. 48. — № 3. — P. 170-175. — URL: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.01086.x> (дата обращения: 16.02.2022).

78. Seminal plasma leptin and spermatozoon apoptosis in patients with varicocele and leucocytospermia / H. Wang, Y. Lv, K. Hu, T. Feng, Y. Jin, Y. Wang, Y. Huang, B. Chen // *Andrologia*. — 2015. — Vol. 47. — № 6. — P. 655-661. — URL: <https://doi.org/10.1111/and.12313> (дата обращения: 19.02.2022).

79. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele / K. P. Nallella, S. S. R. Allamaneni, F. F. Pasqualotto, R. K. Sharma, A. J. Thomas, A. Agarwal // *Urology*. — 2004. — Vol. 64. — № 5. — P. 1010-1013. — URL: [10.1016/j.urology.2004.05.045](https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.05.045) (дата обращения: 01.03.2022).

80. Chen, Q. Testicular immunoregulation and spermatogenesis / Q. Chen, T. Deng, D. Han // *Seminars in cell & developmental biology*. — 2016. — Vol. 59. — P. 157-165. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.019> (дата обращения: 01.03.2022).

81. Tecle, E. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx / E. Tecle, P. Gagneux // *Molecular reproduction and development*. —

2015. — Vol. 82. — № 9. — P. 635-650. — URL: <https://doi.org/10.1002/mrd.22500> (дата обращения: 04.03.2022).

82. Diekman, A. B. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? // Cellular and molecular life sciences : CMLS. — 2003. — Vol. 60. — № 2. — P. 298-308. — URL: <https://doi.org/10.1007/s000180300025> (дата обращения: 04.03.2022).

83. Мусин, Х. Г. Антимикробные пептиды — потенциальная замена традиционным антибиотикам / Х. Г. Мусин // Инфекция и иммунитет. — 2018. — Т. 8. — № 3. — С. 295-308.

84. Semple, F. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? / F. Semple, J. R. Dorin // Journal of innate immunity. — 2012. — Vol. 4. — № 4. — P. 337-348. — URL: <https://doi.org/10.1159/000336619> (дата обращения: 08.03.2022).

85. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans / E. Com, F. Bourgeon, B. Evrard, T. Ganz, D. Colleu, B. Jégou, C. Pineau // Biology of reproduction. — 2003. — Vol. 68. — № 1. — P. 95-104. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005389> (дата обращения: 08.03.2022).

86. The role of DEFB126 variation in male infertility and medically assisted reproduction technique outcome / P. B. Boroujeni, S. Ebrahimian, M. Abedini, M. R. Chayjan, M. Hassani, H. Gourabi, M. A. Sadighi-Gilani, M. Sabbaghian, A. M. Meybodi // Reproductive biomedicine online. — 2019. — Vol. 39. — № 4. — P. 649-657. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.05.012> (дата обращения: 10.03.2022).

87. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis / F. J. Rodríguez-Jiménez, A. Krause, S. Schulz, W. G. Forssmann, J. R. Conejo-Garcia, R. Schreeb, D. Motzkus // Genomics. — 2003. — Vol. 81. — № 2. — P. 175-183. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(02\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(02)00034-4) (дата обращения: 11.03.2022).

88. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice / Y. Yamaguchi, T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, Y. Ouchi // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). —

2002. — Vol. 169. — № 5. — P. 2516-2523. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2516> (дата обращения: 18.03.2022).

89. Lipopolysaccharide-induced epididymitis disrupts epididymal beta-defensin expression and inhibits sperm motility in rats / D. Cao, Y. Li, R. Yang, Y. Wang, Y. Zhou, H. Diao, Y. Zhao, Y. Zhang, J. Lu // *Biology of reproduction*. — 2010. — Vol. 83. — № 6. — P. 1064-1070. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082180> (дата обращения: 21.03.2022).

90. Álvarez, Á. H. Human β -defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior / Á. H. Álvarez, M. Martínez Velázquez, E. Prado Montes de Oca // *The international journal of biochemistry & cell biology*. — 2018. — Vol. 104. — P. 133-137. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.007> (дата обращения: 21.03.2022).

91. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / X. Chen, F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, H. Ogawa // *Journal of dermatological science*. — 2005. — Vol. 40. — № 2. — P. 123-132. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.03.014> (дата обращения: 22.03.2022).

92. Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation / B. F. Kraemer, R. A. Campbell, H. Schwertz, M. J. Cody, Z. Franks, N. D. Tolley, W. H. A. Kahr, S. Lindemann, P. Seizer, C. C. Yost, G. A. Zimmerman, A. S. Weyrich // *PLoS pathogens*. — 2011. — Vol. 7. — № 11. — e1002355. — URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002355> (дата обращения: 22.03.2022).

93. Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action / J. Raschig, D. Mailänder-Sánchez, A. Berscheid, J. Berger, A. A. Strömstedt, L. F. Courth, N. P. Malek, H. Brötz-Oesterhelt, J. Wehkamp // *PLoS pathogens*. — 2017. — Vol. 13. — № 3. — e1006261. — URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006261> (дата обращения: 23.03.2022).

94. A role of human beta defensin-1 in predicting prostatic adenocarcinoma in cases of false-negative biopsy / S. A. Hong, K. H. Kim, T. J. Lee, E. S. Park, M. K. Kim, S. C. Myung // *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. — 2017. — Vol. 125. — № 12. — P. 1063-1069. — URL: <https://doi.org/10.1111/apm.12749> (дата обращения: 23.03.2022).

95. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma / C. Q. Sun, R. Arnold, C. Fernandez-Golarz, A. B. Parrish, T. Almekinder, J. He, S.-m. Ho, P. Svoboda, J. Pohl, F. F. Marshall, J. A. Petros // *Cancer research*. — 2006. — Vol. 66. — № 17. — P. 8542-8549. — URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0294> (дата обращения: 26.03.2022).

96. Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection / R. Diao, K. L. Fok, H. Chen, M. K. Yu, Y. Duan, C. M. Chung, Z. Li, H. Wu, Z. Li, H. Zhang, Z. Ji, W. Zhen, C. F. Ng, Y. Gui, Z. Cai, H. C. Chan // *Science translational medicine*. — 2014. — Vol. 6. — № 249. — 249ra108. — URL: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009071> (дата обращения: 26.03.2022).

97. A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis / P. Caballero-Campo, M. G. Buffone, F. Benencia, J. R. Conejo-García, P. F. Rinaudo, G. L. Gerton // *Journal of cellular physiology*. — 2014. — Vol. 229. — № 1. — P. 68-78. — URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.24418> (дата обращения: 27.03.2022).

98. Effect of recombinant β -defensin 1 protein on human sperm motility and viability / R. Khayamabed, M. Tavalae, S.-S. Taherian, M. H. Nasr-Esfahani // *Andrologia*. — 2020. — Vol. 52. — № 1. — e13455. — URL: <https://doi.org/10.1111/and.13455> (дата обращения: 27.03.2022).

99. The novel human β -defensin 114 regulates lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammation and protects sperm from motility loss / H. Yu, J. Dong, Y. Gu, H. Liu, A. Xin, H. Shi, F. Sun, Y. Zhang, D. Lin, H. Diao // *The Journal of biological*

chemistry. — 2013. — Vol. 288. — № 17. — P. 12270-12282. — URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411884> (дата обращения: 29.03.2022).

100. Human β -defensin 1 in follicular fluid and semen: impact on fertility / L. Zupin, V. Polesello, M. Martinelli, S. Luppi, E. Giolo, G. Zito, F. Romano, L. Segat, S. Crovella, G. Ricci // *Journal of assisted reproduction and genetics*. — 2019. — Vol. 36. — № 4. — P. 787-797. — URL: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01409-w> (дата обращения: 04.04.2022).

101. Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: Effects on bacterial growth and sperm quality / A. Puig-Timonet, M. Castillo-Martín, B. A. Pereira, E. Pinart, S. Bonet, M. Yeste // *Theriogenology*. — 2018. — Vol. 111. — P. 9-18. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.014> (дата обращения: 08.04.2022).

102. Human beta-defensin DEFB126 is capable of inhibiting LPS-mediated inflammation / H. Liu, H. Yu, Y. Gu, A. Xin, Y. Zhang, H. Diao, D. Lin // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2013. — Vol. 97. — № 8. — P. 3395-3408. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4588-9> (дата обращения: 08.04.2022).

103. Huang, L. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27 / L. Huang, S. S. J. Leong, R. Jiang // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2009. — Vol. 84. — № 2. — P. 301-308. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1982-z> (дата обращения: 12.04.2022).

104. Rat recombinant β -defensin 22 is a heparin-binding protein with antimicrobial activity / H. Diao, H.-G. Yu, F. Sun, Y.-L. Zhang, N. Tanphaichitr // *Asian Journal of Andrology*. — 2011. — Vol. 13. — № 2. — P. 305-311. — URL: <https://doi.org/10.1038/aja.2010.93> (дата обращения: 18.04.2022).

105. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies / A. I. Yudin, S. E. Generao, T. L. Tollner, C. A. Treece, J. W. Overstreet, G. N. Cherr // *Biology of reproduction*. — 2005. — Vol. 73. — № 6. — P. 1243-1252. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042432> (дата обращения: 27.04.2022).

106. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility / T. L. Tollner, S. A. Venners, E. J. Hollox, A. I. Yudin, X. Liu, G. Tang, H. Xing, R. J. Kays, T. Lau, J. W. Overstreet, X. Xu, C. L. Bevins, G. N. Cherr // *Science translational medicine*. — 2011. — Vol. 3. — № 92. — 92ra65. — URL: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002289> (дата обращения: 29.04.2022).

107. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx / A. I. Yudin, C. A. Treece, T. L. Tollner, J. W. Overstreet, G. N. Cherr // *The Journal of membrane biology*. — 2005. — Vol. 207. — № 3. — P. 119-129. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0806-z> (дата обращения: 29.04.2022).

108. Suarez, S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct / S. S. Suarez // *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. — 2002. — Vol. 37. — № 3. — P. 140-143. — URL: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00346.x> (дата обращения: 03.05.2022).

109. Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia / T. L. Tollner, A. I. Yudin, A. F. Tarantal, C. A. Treece, J. W. Overstreet, G. N. Cherr // *Biology of reproduction*. — 2008. — Vol. 78. — № 3. — P. 400-412. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064071> (дата обращения: 03.05.2022).

110. Aram, R. Beta-defensin126 is correlated with sperm motility in fertile and infertile men / R. Aram, P. T. K. Chan, D. G. Cyr // *Biology of reproduction*. — 2020. — Vol. 102. — № 1. — P. 92-101. — URL: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox171> (дата обращения: 12.05.2022).

111. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons / P. A. Frischmeyer, A. van Hoof, K. O'Donnell, A. L. Guerrerio, R. Parker, H. C. Dietz // *Science (New York, N.Y.)*. — 2002. — Vol. 295. — № 5563. — P. 2258-2261. — URL: <https://doi.org/10.1126/science.1067338> (дата обращения: 12.05.2022).

112. Isken, O. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function / O. Isken, L. E. Maquat // *Genes & development*. — 2007. —

Vol. 21. — № 15. — P. 1833-1856. — URL: <https://doi.org/10.1101/gad.1566807> (дата обращения: 13.05.2022).

113. Arribere, J. A. Nonsense mRNA suppression via nonstop decay / J. A. Arribere, A. Z. Fire // *eLife*. — 2018. — Vol. 7. — URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.33292> (дата обращения: 17.05.2022).

114. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons / P. A. Frischmeyer, A. van Hoof, K. O'Donnell, A. L. Guerrierio, R. Parker, H. C. Dietz // *Science (New York, N.Y.)*. — 2002. — Vol. 295. — № 5563. — P. 2258-2261. — URL: <https://doi.org/10.1126/science.1067338> (дата обращения: 25.05.2022).

115. Maquat, L. E. Molecular biology. Skiing toward nonstop mRNA decay / L. E. Maquat // *Science (New York, N.Y.)*. — 2002. — Vol. 295. — № 5563. — P. 2221-2222. — URL: <https://doi.org/10.1126/science.1071285> (дата обращения: 30.05.2022).

116. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia / A. Chatr-Aryamontri, M. Angelini, E. Garelli, G. Tchernia, U. Ramenghi, I. Dianzani, F. Loreni // *Human mutation*. — 2004. — Vol. 24. — № 6. — P. 526-533. — URL: <https://doi.org/10.1002/humu.20117> (дата обращения: 30.05.2022).

117. A nonstop mutation in the factor (F)X gene of a severely haemorrhagic patient with complete absence of coagulation FX / A. Ameri, D. K. Machiah, T. T. Tran, C. Channell, V. Crenshaw, K. Fernstrom, M. Khachidze, A. Duncan, S. Fuchs, T. E. Howard // *Thrombosis and haemostasis*. — 2007. — Vol. 98. — № 6. — P. 1165-1169. — URL: <https://doi.org/10.1160/th07-02-0125> (дата обращения: 03.06.2022).

118. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus / T. L. Tollner, A. I. Yudin, C. A. Treece, J. W. Overstreet, G. N. Cherr // *Human reproduction (Oxford, England)*. — 2008. — Vol. 23. — № 11. — P. 2523-2534. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/den276> (дата обращения: 04.06.2022).

119. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth / Y. Akgul, R. A. Word, L. M. Ensign, Y. Yamaguchi, J. Lydon, J. Hanes, M.

Mahendroo // *The Journal of clinical investigation*. — 2014. — Vol. 124. — № 12. — P. 5481-5489. — URL: <https://doi.org/10.1172/JCI78765> (дата обращения: 04.06.2022).

120. Testicular innate immune defense against bacteria / S. Bhushan, H.-C. Schuppe, S. Tchatalbachev, M. Fijak, W. Weidner, T. Chakraborty, A. Meinhardt // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2009. — Vol. 306. — №1-2. — P. 37-44. — <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.017> (дата обращения: 12.06.2022).

121. Iwasaki, A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Science (New York, N.Y.)*. — 2010. — Vol. 327. — № 5963. — P. 291-295. — URL: <https://doi.org/10.1126/science.1183021> (дата обращения: 12.06.2022).

122. Kumar, H. Pathogen recognition by the innate immune system / H. Kumar, T. Kawai, S. Akira // *International reviews of immunology*. — 2011. — Vol. 30. — № 1. — P. 16-34. — URL: <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976> (дата обращения: 13.06.2022).

123. Toll-like receptor-initiated testicular innate immune responses in mouse Leydig cells / T. Shang, X. Zhang, T. Wang, B. Sun, T. Deng, D. Han // *Endocrinology*. — 2011. — Vol. 152. — № 7. — P. 2827-2836. — URL: <https://doi.org/10.1210/en.2011-0031> (дата обращения: 17.06.2022).

124. Hedger, M. P. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation--a perspective / M. P. Hedger // *Journal of reproductive immunology*. — 2011. — Vol. 88. — № 2. — P. 130-141. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.010> (дата обращения: 17.06.2022).

125. Kanneganti, T.-D. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease / T.-D. Kanneganti, M. Lamkanfi, G. Núñez // *Immunity*. — 2007. — Vol. 27. — № 4. — P. 549-559. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.002> (дата обращения: 18.06.2022).

126. Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells / S. Bhushan, S. Tchatalbachev, J. Klug, M. Fijak, C. Pineau, T. Chakraborty, A. Meinhardt // *Journal of*

immunology (Baltimore, Md. : 1950). — 2008. — Vol. 180. — № 8. — P. 5537-5547. — URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5537> (дата обращения: 23.06.2022).

127. A noncanonical role of NOD-like receptor NLRP14 in PGCLC differentiation and spermatogenesis / Y. Yin, S. Cao, H. Fu, X. Fan, J. Xiong, Q. Huang, Y. Liu, K. Xie, T.-G. Meng, Y. Liu, D. Tang, T. Yang, B. Dong, S. Qi, L. Nie, H. Zhang, H. Hu, W. Xu, F. Li, L. Dai, Q.-Y. Sun, Z. Li // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2020. — Vol. 117. — № 36. — P. 22237-22248. — URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.2005533117> (дата обращения: 23.06.2022).

128. Hall, S. Host defense proteins of the male reproductive tract / S. Hall, F. S. Hamil, F. S. French // *Journal of Andrology*. — 2013. — Vol. 23. — № 5. — P. 585-597. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02295.x?sid=nlm%3Apubmed> (дата обращения: 26.06.2022).

129. Toll-like receptor 3-initiated antiviral responses in mouse male germ cells in vitro / T. Wang, X. Zhang, Q. Chen, T. Deng, Y. Zhang, N. Li, T. Shang, Y. Chen, D. Han // *Biology of reproduction*. — 2012. — Vol. 86. — № 4. — P. 106. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096719> (дата обращения: 30.06.2022).

130. Toll-like receptor 11-initiated innate immune response in male mouse germ cells / Q. Chen, W. Zhu, Z. Liu, K. Yan, S. Zhao, D. Han // *Biology of reproduction*. — 2014. — Vol. 90. — № 2. — P. 38. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114421> (дата обращения: 30.06.2022).

131. Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa / M. A. Palladino, M. A. Savarese, J. L. Chapman, M.-K. Dughi, D. Plaska // *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). — 2008. — Vol. 60. — № 6. — P. 541-555. — URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00654.x> (дата обращения: 05.07.2022).

132. SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human / L. W.-C. Belinda, W. X. Wei, B. T. H. Hanh, L. X. Lei, H. Bow, D. J. Ling // *Molecular immunology*. — 2008. — Vol. 45. — № 6. — P. 1732-1742. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.030> (дата обращения: 05.07.2022).

133. Influence of urogenital infection on sperm function / T. Diemer, M. Ludwig, P. Huwe, D. B. Hales, W. Weidner // *Current opinion in urology*. — 2000. — Vol. 10. — № 1. — P. 39-44. — URL: [10.1097/00042307-200001000-00010](https://doi.org/10.1097/00042307-200001000-00010) (дата обращения: 06.07.2022).

134. Caroppo, E. Understanding sperm motility regulation: it's a long road ahead / E. Caroppo // *Fertility and sterility*. — 2021. — Vol. 115. — № 2. — P. 311-312. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.09.010> (дата обращения: 06.07.2022).

135. TLR signalling affects sperm mitochondrial function and motility via phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 α / X. Zhu, D. Shi, X. Li, W. Gong, F. Wu, X. Guo, H. Xiao, L. Liu, H. Zhou // *Cellular signalling*. — 2016. — Vol. 28. — № 3. — P. 148-156. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.12.002> (дата обращения: 11.07.2022).

136. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway // *Science* (New York, N.Y.). — 2002. — Vol. 296. — № 5573. — P. 1655-1657. — URL: <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655> (дата обращения: 11.07.2022).

137. Harwood, A. J. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor / A. J. Harwood // *Cell*. — 2001. — Vol. 105. — № 7. — P. 821-824. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00412-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00412-3) (дата обращения: 15.07.2022).

138. Bijur, G. N. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria / G. N. Bijur, R. S. Jope // *Neuroreport*. — 2003. — Vol. 14. — № 18. — P. 2415-2419. — <https://doi.org/10.1097/00001756-200312190-00025> (дата обращения: 17.07.2022).

139. Targeted disruption of glycogen synthase kinase 3A (GSK3A) in mice affects sperm motility resulting in male infertility / R. Bhattacharjee, S. Goswami, T. Dudiki, A. P. Popkie, C. J. Phiel, D. Kline, S. Vijayaraghavan // *Biology of reproduction*. — 2015. — Vol. 92. — № 3. — P. 65. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124495> (дата обращения: 21.07.2022).

140. Tsan, M.-F. Heat shock proteins and immune system / M.-F. Tsan, B. Gao // *Journal of leukocyte biology*. — 2009. — Vol. 85. — № 6. — P. 905-910. — URL: <https://doi.org/10.1189/jlb.0109005> (дата обращения: 27.07.2022).

141. The link between small heat shock proteins and the immune system / J. M. van Noort, M. Bsibsi, P. Nacken, W. H. Gerritsen, S. Amor // *The international journal of biochemistry & cell biology*. — 2012. — Vol. 44. — № 10. — P. 1670-1679. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.010> (дата обращения: 27.07.2022).

142. Понасенко, О. А. Роль белка теплового шока 70 в патогенезе сердечно-сосудистой патологии / О. А. Понасенко, Л. В. Ганковская, О. А. Свитич // *Медицинская иммунология*. — 2019. — Т. 21. — № 2. — С. 201-208.

143. Chen, T. Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity / T. Chen, X. Cao // *European journal of immunology*. — 2010. — Vol. 40. — № 6. — P. 1541-1544. — URL: <https://doi.org/10.1002/eji.201040616> (дата обращения: 29.07.2022).

144. Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity / P. Srivastava // *Nature reviews. Immunology*. — 2002. — Vol. 2. — № 3. — P. 185-194. — URL: <https://doi.org/10.1038/nri749> (дата обращения: 29.07.2022).

145. Multhoff, G. Heat shock proteins in immunity / G. Multhoff // *Handbook of experimental pharmacology*. — 2006. — № 172. — P. 279-304. — URL: https://doi.org/10.1007/3-540-29717-0_12 (дата обращения: 10.08.2022).

146. Sarge, K. D. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis / K. D. Sarge, K. E. Cullen // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. — 1997. — Vol. 53. — № 2. — P. 191-197. — URL: <https://doi.org/10.1007/pl00000591> (дата обращения: 10.08.2022).

147. Chen, T. Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity / T. Chen, X. Cao // *European journal of immunology*. — 2010. — Vol. 40. — № 6. — P. 1541-1544. — URL: <https://doi.org/10.1002/eji.201040616> (дата обращения: 10.08.2022).

148. Characterization of the heat shock protein P70 in rat spermatogenic cells / L. S. Raab, K. L. Polakoski, L. W. Hancock, D. W. Hamilton // *Molecular reproduction and development*. — 1995. — Vol. 40. — № 2. — P. 186-195. — URL: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080400207> (дата обращения: 10.08.2022).

149. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars / S. Y. Huang, Y. H. Kuo, Y. P. Lee, H. L. Tsou, E. C. Lin, C. C. Ju, W. C. Lee // *Animal reproduction science*. — 2000. — Vol. 63. — №3-4. — P. 231-240. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00175-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00175-5) (дата обращения: 20.08.2022).

150. The role of heat shock protein 70 (Hsp 70) in male infertility: is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? / G. O. Erata, N. Koçak Toker, O. Durlanik, A. Kadioğlu, G. Aktan, G. Aykaç Toker // *Fertility and sterility*. — 2008. — Vol. 90. — № 2. — P. 322-327. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.021> (дата обращения: 21.08.2022).

151. Understanding the role of heat shock protein isoforms in male fertility, aging and apoptosis / K. Purandhar, P. K. Jena, B. Prajapati, P. Rajput, S. Seshadri // *The world journal of men's health*. — 2014. — Vol. 32. — № 3. — P. 123-132. — URL: <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.3.123> (дата обращения: 21.08.2022).

152. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition / B. Nixon, E. G. Bromfield, M. D. Dun, K. A. Redgrove, E. A. McLaughlin, R. J. Aitken // *Asian Journal of Andrology*. — 2015. — Vol. 17. — № 4. — P. 568-573. — URL: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.151395> (дата обращения: 28.08.2022).

153. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa / A. P. Cedenho, S. B. Lima, M. A. Cenedeze, D. M. Spaine, V. Ortiz, S. Oehninger // *Human reproduction* (Oxford, England). — 2006. — Vol. 21. — № 7. — P. 1791-1794. — URL: <https://doi.org/10.1093/humrep/del055> (дата обращения: 28.08.2022).

154. The role of heat shock proteins in reproduction / A. Neuer, S. D. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks, S. S. Witkin // *Human reproduction update*. — 2000. — Vol. 6. — № 2. — P. 149-159. — URL: <https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.149> (дата обращения: 02.09.2022).

155. [Heat shock protein 90 in male reproduction] / L. Zhou, H. Jian-Hao, Y. Chen, S. Q. Zhang // *Zhonghua Nan Ke Xue = Natural journal of andrology*. — 2021. — Vol. 27. — № 4. — P. 351-355.

156. Gruppi, C. M. Stage and lineage-regulated expression of two hsp90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis / C. M. Gruppi, Z. F. Zakeri, D. J. Wolgemuth // *Molecular reproduction and development*. — 1991. — Vol. 28. — № 3. — P. 209-217. — URL: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280302> (дата обращения: 07.09.2022).

157. Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) family in mouse and human sperm and testis / Y. Li, J. Sosnik, L. Brassard, M. Reese, N. A. Spiridonov, T. C. Bates, G. R. Johnson, J. Anguita, P. E. Visconti, A. M. Salicioni // *Molecular human reproduction*. — 2011. — Vol. 17. — № 1. — P. 42-56. — URL: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq071> (дата обращения: 07.09.2022).

158. Heat shock protein 90 functions to stabilize and activate the testis-specific serine/threonine kinases, a family of kinases essential for male fertility / K. N. Jha, A. R. Coleman, L. Wong, A. M. Salicioni, E. Howcroft, G. R. Johnson // *The Journal of biological chemistry*. — 2013. — Vol. 288. — № 23. — P. 16308-16320. — URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400978> (дата обращения: 08.09.2022).

159. Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium / A. Meinhardt, M. Parvinen, M. Bacher, G. Aumüller, H. Hakovirta, A. Yagi, J. Seitz // *Biology of reproduction*. — 1995. — Vol. 52. — № 4. — P. 798-807. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.4.798> (дата обращения: 08.09.2022).

160. Werner, A. Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men / A. Werner, A. Meinhardt, J. Seitz, M. Bergmann // *Cell and tissue research*. — 1997. — Vol. 288. — № 3. — P. 539-544. — URL: <https://doi.org/10.1007/s004410050839> (дата обращения: 08.09.2022).

161. Harrison, R. G. Abdomino-testicular temperature gradients / R.G. Harrison, J.S. Weiner // *J. Physiol.* — 1948. — №107. — P. 48-49.

162. Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation / Y. Fang, Y. Su, J. Xu, Z. Hu, K. Zhao, C. Liu, H. Zhang // *Frontiers in immunology*. — 2021. — Vol. 12. — P. 729539. — URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729539> (дата обращения: 15.09.2022).

163. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека / Всемирная организация здравоохранения; научный редактор д.б.н., проф. Курило Л.Ф. – 5-е изд. - Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ», 2012. – 305 с. – ISBN 978-5-905106-09-05. – Текст : непосредственный.

164. Значение пептидов семейства β -дефензинов в снижении мужской репродуктивной функции / Е. М. Хасанова, Л. В. Ганковская, В. В. Греченко, О. А. Свитич // Иммунология. — 2021. — Т. 42. — № 5. — С. 16-25.

165. ПЦР "в реальном времени" / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, [и др.] ; Москва : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с. – ISBN: 978-5-9963-0086-0. – Текст: непосредственный.

166. Analysis of amplification and association polymorphisms in the bovine beta-defensin 129 (BBD129) gene revealed its function in bull fertility / S. Solanki, P. Kashyap, S. A. Ali, V. Kumar, A. Vats, M. Pukhrambam, R. Kumar, S. De, T. K. Datta // Scientific reports. — 2022. — Vol. 12. — № 1. — P. 19042. — URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23654-3> (дата обращения: 30.11.2022).

167. Decreased Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 Expression in Spermatozoa in Couples with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion (URSA) / N. Sereshki, A. Andalib, A. Ghahiri, F. Mehrabian, R. Sherkat, A. Rezaei // Iranian journal of allergy, asthma, and immunology. — 2019. — Vol. 18. — № 6. — P. 701-706. — URL: <https://doi.org/10.18502/ijaa.v18i6.2183> (дата обращения: 30.11.2022).

168. Zakeri, Z. F. Characterization and inducibility of hsp 70 proteins in the male mouse germ line / Z. F. Zakeri, W. J. Welch, D. J. Wolgemuth // The Journal of cell biology. — 1990. — Vol. 111. — №5 Pt 1. — P. 1785-1792. — URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.111.5.1785> (дата обращения: 01.12.2022).

169. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice / J. C. Rockett, F. L. Mapp, J. B. Garges, J. C. Luft, C. Mori, D. J. Dix // Biology of reproduction. — 2001. — Vol. 65. — № 1. — P. 229-239. — URL: <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.229> (дата обращения: 01.12.2022).

170. Furuya, Y. Soluble Fas and interleukin-6 and interleukin-8 levels in seminal plasma of infertile men / Y. Furuya, T. Akashi, H. Fuse // Archives of andrology. — 2003.

— Vol. 49. — № 6. — P. 449-452. — URL: <https://doi.org/10.1080/01485010390219926> (дата обращения: 02.12.2022).

171. Role of Interleukin 1, IL-18 and Tumor Necrosis Factor Alpha Levels in Seminal Plasma of Infertile Males in Hillah Patients / A. H. Al-Marzoqi, H. J. Hussein, H. Sh. O. Al-Janabi, H. K. Ibraheem, Z. M. A. Taeq // *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. — 2013. — Vol. 3. — № 3. — P. 165-171. — URL: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/4762> (дата обращения: 05.12.2022).

172. Pastuszak, A. W. Varicocele and testicular function / A. W. Pastuszak, R. Wang // *Asian Journal of Andrology*. — 2015. — Vol. 17. — № 4. — P. 659-667. — URL: https://journals.lww.com/ajandrology/Fulltext/2015/17040/Varicocele_and_testicular_function.23.aspx (дата обращения: 05.12.2022).

173. Schoor, R. A. The pathophysiology of varicocele-associated male infertility / R. A. Schoor, S. M. Elhanbly, C. Niederberger // *Current urology reports*. — 2001. — Vol. 2. — № 6. — P. 432-436. — URL: <https://doi.org/10.1007/s11934-001-0035-7> (дата обращения: 07.12.2022).

174. Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response / M. G. Santoro // *Biochemical pharmacology*. — 2000. — Vol. 59. — № 1. — P. 55-63. — URL: [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00299-3](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00299-3) (дата обращения: 08.12.2022).

175. Comparative Expression Analysis of HSP70, HSP90, IL-4, TNF, KITLG and KIT-receptor Gene between Varicocele-Induced and Non-Varicocele Testes of Dog / H. Hassanpour, A. Bigham Sadegh, I. Karimi, H. Heidari Khoei, A. Karimi, P. Edalati Shaarbaf, T. Karimi Shayan // *International journal of fertility & sterility*. — 2017. — Vol. 11. — № 3. — P. 148-155. — URL: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.5020> (дата обращения: 23.12.2022).

176. Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele / A. Ferlin, E. Speltra, C. Patassini, M. A. Pati, A. Garolla, N. Caretta, C. Foresta // *The Journal of urology*. — 2010. — Vol. 183. — № 3. — P. 1248-1252. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.11.009> (дата обращения: 27.12.2022).

177. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the seminal plasma of infertile men suffering from varicocele / M. Zeinali, A. Hadian Amree, H. Khorramdelazad, H. Karami, M. Abedinzadeh // *Andrologia*. — 2017. — Vol. 49. — № 6. — URL: <https://doi.org/10.1111/and.12685> (дата обращения: 19.01.2023).

178. Experimental study of the effect of rhTNF-alpha on human sperm mitochondrial function and motility in vitro / J. Bian, X. Guo, C. Xiong, J. Li, [et al.] // *Zhonghua Nan Ke Xue = Natural journal of andrology*. — 2004. — №. 10. — P. 415-419.

179. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with semen parameters in fertile and infertile men / I. Koçak, C. Yenisey, M. Dündar, P. Okyay, M. Serter // *Urological research*. — 2002. — Vol. 30. — № 4. — P. 263-267. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00240-002-0269-y> (дата обращения: 13.02.2023).

180. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis / H. Levine, N. Jørgensen, A. Martino-Andrade, J. Mendiola, D. Weksler-Derri, I. Mindlis, R. Pinotti, S. H. Swan // *Human reproduction update*. — 2017. — Vol. 23. — № 6. — P. 646-659. — URL: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022> (дата обращения: 14.02.2023).

181. Impacts of Outdoor Air Pollution on Human Semen Quality: A Meta-Analysis and Systematic Review / J. Zhang, Z. Cai, C. Ma, J. Xiong, H. Li // *BioMed research international*. — 2020. — Vol. 2020. — P. 7528901. — URL: <https://doi.org/10.1155/2020/7528901> (дата обращения: 15.02.2023).

182. Ганковская, О. А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием / О. А. Ганковская // *Медицинская иммунология*. — 2010. — Т. 12. — № 1-2. — С. 87-94.

183. Патент N 2759147 Российская федерация, МПК C12Q 1/68. Способ оценки репродуктивной функции мужчин с идиопатическим бесплодием : N 2021105736 : заявл. 05.03.2021 : опубл. 11.09.2021 / Ганковская Л. В., Хасанова Е. М., Митюшина Н. Г. // Реестр изобретений Российской Федерации URL:

https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2759147&TypeFile=html (дата обращения: 13.07.2023).

184. 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.