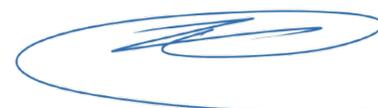


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Галимов Камиль Шамилович

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

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Литвицкий Пётр Францевич

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Молекулярные и генетические механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска.....	15
1.2. Структурно-функциональные особенности митохондрий сперматозоидов при мужском бесплодии.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Объекты, материал и методы исследования.....	37
2.2. Биохимические методы исследования спермы.....	40
2.3. Молекулярно-генетические исследования спермы.....	42
2.4. Статистические методы анализа результатов исследования.....	44
ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ..	45
3.1. Особенности обследованных пациентов.....	45
3.2. Характеристика спермограммы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием.....	46
3.3. Состояние энергетического обмена семенной плазмы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием.....	49
3.4. Изменение процессов энергопродукции в митохондриях у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием.....	55
3.5. Оценка содержания ключевых энергетических субстратов в семенной плазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием.....	57
3.6. Изменение активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием.....	61
3.7. Динамика показателей состояния системы креатинфосфокиназа/креатин как критерий изменения качества спермы.....	63
ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ...	66
4.1. Мутации гена митохондриального цитохрома В и их роль в развитии мужского бесплодия.....	66

4.2. Роль ассоциации полиморфных локусов rs25487 и rs415407 гена белка XRCC1 в развитии мужского бесплодия.....	68	
ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ		
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ МУЖСКОМ ИДИОПАТИЧЕСКОМ		
БЕСПЛОДИИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЕГО		
РАЦИОНАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИИ.....		73
5.1. Соотношение про- и антиоксидантных систем эякулята при		
идиопатическом мужском бесплодии.....	73	
5.2. Роль фрагментации ДНК сперматозоидов в развитии мужского		
бесплодия.....	78	
5.3. Влияние биологически активных добавок на течение		
свободнорадикальных процессов в модельных системах.....	81	
ОБСУЖДЕНИЕ.....	87	
ВЫВОДЫ.....	107	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Мужское бесплодие является глобальной проблемой современной системы здравоохранения [1-9]. В различных странах мира оно выявляется в среднем у 15 % мужчин репродуктивного возраста. В период с 1990 по 2017 гг. стандартизированная по возрасту распространенность этой формы патологии ежегодно увеличивалась на 0,29% [10].

В настоящее время у каждого двадцатого молодого мужчины количество сперматозоидов недостаточно для нормального выполнения функции воспроизводства [11]. В России число мужчин с бесплодием за последние два десятилетия увеличилось более чем в 2 раза [12].

Конкретные причины и механизмы ухудшения репродуктивного здоровья мужчин исследованы недостаточно, несмотря на интенсивную разработку этой проблемы [13-15]. Количество статей, индексируемых в PubMed по этой тематике, превысило 56 тыс., в том числе более 20 тыс. из них за последнее десятилетие. Так, активно изучаются аспекты диагностики и лечения мужского бесплодия на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях [2, 16-18]. Сдвиг парадигмы к протеомным, транскриптомным и т.п. исследованиям выявил несколько кандидатов на роль биомаркеров, которые ассоциированы с многочисленными причинами бесплодия. В то же время, не достигнуто значительного прогресса в ответах на фундаментальные вопросы андрологии. Кроме того, еще недостаточно надежных методов диагностики и эффективных стратегий ведения женщин и мужчин после интрацитоплазматического введения в яйцеклетку сперматозоида и других процедур ЭКО.

Одним из нерешенных является вопрос о роли митохондрий сперматозоидов в генезе репродуктивных нарушений. В фокусе научных поисков причин и механизмов дисфункции митохондрий сперматозоидов, в том числе при

мужском бесплодии, находятся три основных направления: расстройства энергетического обеспечения гамет, интенсификация в них окислительного стресса и процесса апоптоза [19].

Митохондрии занимают центральное место в метаболизме сперматозоидов. Это обусловлено участием митохондрий в синтезе макроэргических фосфатов и поддержании окислительно-восстановительного потенциала (ОВП); регуляции пролиферации и дифференцировки сперматозоидов; их апоптоза и митофагии; генерации активных форм кислорода; реализации внутриклеточного сигналинга и других процессов, обеспечивающих подвижность жгутиков, капацитацию, акросомальную реакцию, активацию ооцитов и слияние гамет [20]. В большинстве случаев изменения этих процессов в сперматозоидах ассоциированы с субфертильностью и/или бесплодием мужчин.

Продемонстрирована также тесная связь между изменениями в митохондриальном геноме, протеоме, метаболоме и оплодотворяющей способностью сперматозоидов. Выявлены ключевые белки митохондрий (АТФ-синтаза, сиртуины и др.), участвующие в репродуктивном процессе. Показана корреляция aberrантной экспрессии генов этих белков с ухудшением качественных и количественных характеристик эякулята [21]. Доказана облигатная роль в метаболизме сперматозоидов таких энергетических субстратов митохондрий как лактат и длинноцепочечные жирные кислоты.

Интегральным показателем метаболического и энергетического статуса клеток, в том числе сперматозоидов, считается соотношение $[NAD^+]/[NADH]$ [22, 23]. Редокс-состояние пиридиннуклеотидов – важнейший показатель гомеостаза и индикатор интенсивности метаболизма, а также регулятор передачи внутриклеточных сигналов в ответ на стимулы, включая стрессорные. NAD^+ используется в качестве субстрата поли(АДФ-рибоза)-полимеразами и сиртуинами, чьи мишени и конечные продукты регулируют рост и продолжительность жизни сперматозоидов. При низком уровне NAD^+ в них тормозится ацетилирование гистонов, их замещение протаминами в ходе

спермиогенеза, растет доля аномальных сперматозоидов. Сиртуины являются модуляторами метаболических и стрессиндуцированных реакций. Благодаря их активации, пиридиннуклеотиды интегрируют окислительно-восстановительное состояние с сигнальными и транскрипционными процессами как на уровне митохондрий, так и других клеточных компартментов [24].

Степень разработанности темы исследования

Роль митохондрий в энергетическом обеспечении сперматозоидов является предметом дискуссий [19, 25]. Ресинтез АТФ в сперматозоидах базируется на трех процессах (гликолизе, окислительном фосфорилировании, β -окислении) и четырех субстратах (глюкозе, лактате, фруктозе, жирных кислотах). Конкретный вклад их в общий баланс энергии в норме и при развитии различных форм патологии активно изучается.

В серии «омиксных» исследований получены доказательства ведущей роли в развитии тяжелых форм мужского бесплодия aberrантной экспрессии белков митохондрий, причастных, прежде всего, к энергопродукции, регуляции апоптоза и митофагии [26; 27].

Характерной чертой митохондриального генома является большая скорость накопления мутаций и высокий полиморфизм. Эти особенности объясняются отсутствием в органелле защитных гистонов и механизмов репарации ДНК, что увеличивает частоту ошибок ее репликации, а также, учитывая близость мтДНК к комплексам дыхательной цепи, патогенным воздействием активных форм кислорода (АФК) [28]. Многие митохондриальные однонуклеотидные полиморфизмы (mtSNP) закрепились в различных популяциях в ходе эволюции человека. Из-за исключительно материнского наследования мтДНК и того факта, что геном митохондрий не рекомбинирует, их SNP накапливаются и передаются потомкам по материнской линии [29].

Мутации мтДНК, как правило, тесно связаны с нарушением энергообеспечения сперматозоидов, что может приводить к различным формам их патологии, в том числе к астенозооспермии, олигозооспермии и тератозооспермии. Опубликовано большое количество работ, посвященных роли мтДНК в развитии мужского бесплодия, однако данные о роли мутаций в гене митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*) и гена белка репарации ДНК *XRCC1* при мужском бесплодии единичны [30-32]. Мутации митохондриальных генов сопровождаются различными нарушениями, особенно в комплексе III, что может прерывать процесс продукции АТФ. Вместе с тем, отсутствуют аналитические исследования связи генетического и биохимического статуса сперматозоидов в норме и при идиопатическом мужском бесплодии, а также их влияния на исходы процедур ВРТ.

Цель и задачи исследования

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

Задачи:

1. Исследовать изменения показателей состояния митохондрий сперматозоидов при идиопатическом мужском бесплодии: процессов их энергетического обеспечения; окислительно-восстановительного потенциала системы пиридиннуклеотидов; уровней цАМФ, АТФ, кальция; основных энергетических субстратов и активности ферментов их превращений.
2. Оценить возможность и перспективы использования данных о содержании кофермента НАД⁺ и редокс-потенциале эякулята в качестве биомаркера диагностики и предиктора мужского бесплодия.
3. Изучить полиморфизм генов митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*) и белка репарации ДНК *XRCC1*, а также их сопряженность с метаболическими расстройствами у пациентов с различными типами нарушения спермограммы.

4. Выявить наличие и степень ассоциации между выраженностью фрагментации ДНК сперматозоидов и уровнем их редокс-потенциала как меры окислительного стресса в норме и при идиопатическом мужском бесплодии.
5. Исследовать в эксперименте на модельных системах *in vitro* эффективность карнитинсодержащих препаратов с антиоксидантной активностью для лечения мужского бесплодия; сформулировать критерии их рационального назначения.

Научная новизна

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

Впервые показано, что совокупность указанных метаболических и генетических изменений является существенным фактором риска нарушения процесса оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом и, как следствие – развития мужского бесплодия.

Выявлено, что при патоспермии и идиопатическом мужском бесплодии имеется закономерная прямая связь между величиной редокс-потенциала (значением коэффициента $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$) и концентрацией в эякуляте сперматозоидов, отсутствующая у фертильных доноров.

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

По результатам исследования предложена количественная оценка пределов колебаний редокс-потенциала сперматозоидов. Выявлены и описаны преимущества колориметрического метода оценки указанного потенциала эякулята, что позволяет рекомендовать использование этого метода при обследовании мужчин с различными формами патологии репродуктивной функции.

На основе полученных данных предложены методы оценки риска мужского бесплодия и релевантные молекулярные предикторы для персонифицированного подхода к пациентам при проведении диагностических мероприятий и формировании индивидуализированной стратегии лечения.

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

Методология и методы исследования

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

Объектом изучения были бесплодные мужчины (n=170), состоящие в браке со здоровыми женщинами от 1 года до 8 лет. В группу сравнения вошли фертильные доноры спермы, имеющие здоровых детей (n=60).

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Мужское бесплодие в существенной мере является результатом митохондриальной дисфункции сперматозоидов. В её основе: нарушение энергетического обеспечения метаболических процессов, характеризующееся снижением редокс-потенциала сперматозоидов, уровней АТФ, цАМФ и ионов кальция; дисбаланс основных субстратов окисления; недостаточная активность ключевых ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот; изменения в геноме, заключающиеся в ассоциации генотипа rs527236194*CC

митохондриального цитохрома В (MT-CYB), аллеля rs25487*G и генотипа rs25487*GG белка XRCC1 с астенотератозооспермией.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2018); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в образовании и медицине» (Махачкала, 2018); Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2022); XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей

«Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022); Всероссийской научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты естественнонаучного образования» (Чебоксары, 2022); XXI научной конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Молодые ученые - медицине» (Владикавказ, 2022); XI научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку» (Москва, 2022); Всероссийской молодежной научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Современная наука, актуальные вопросы, достижения и инновации» (Уфа, 2022); XXXII Международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра (Казань, 2022); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции «Фундаментальные исследования в медицине: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Уфа, 2023).

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах патофизиологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе: в изданиях из Перечня Сеченовского Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России - 2 статьи, отражающих основные результаты диссертации (1 - научная статья, 1 - обзор); в журналах, включенных в международные базы Web of Science/Scopus - 6 статей, отражающих основные результаты диссертации (3 - научные статьи, 3 - обзора); в иных изданиях - 3 статьи.

Патентов на изобретение - 2.

Личный вклад автора

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

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярные и генетические механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска

В последнее десятилетие наблюдается экспоненциальный рост исследований, посвященных различным аспектам репродуктивного здоровья мужчин [33]. Увеличение случаев бесплодия, сочетающееся со снижением качества спермы, объясняет повышенный интерес научного сообщества к этой проблеме для поиска основных причин и факторов риска, выявления ключевых звеньев патогенеза и разработки эффективных методов профилактики и лечения этой формы патологии [12, 34, 35].

Мужское бесплодие – многофакторное заболевание, включающее широкий спектр расстройств. Эндокринные и иммуногенные нарушения, анатомические и генетические аномалии, инфекции половых путей влияют на репродуктивный потенциал [36; 37]. Возраст, стресс, ожирение, образ жизни, курение, алкоголь, профессиональный маршрут, также ассоциированы с мужским бесплодием [38; 39; 40].

В большинстве случаев причины снижения фертильности остаются неизвестными и, по различным оценкам, от 20 до 75% диагностированного мужского бесплодия считается идиопатическим [1]. Несмотря на высокую распространенность, этиология этой формы бесплодия мало изучена. Вместе с тем, использование новых технологий секвенирования генома позволило выявить большое количество редких точечных мутаций, ответственных за нарушение различных сторон репродуктивного процесса [41]. Помимо моногенных мутаций, распространенными генетическими причинами бесплодия являются анеуплоидии, такие как синдром Клайнфельтера и мутации Y-хромосомы, которые в совокупности составляют до 20-25% всех случаев необструктивной азооспермии [42].

Избыточный окислительный стресс также рассматривается как одна из причин мужской инфертильности [43]. По меньшей мере, у 40% пациентов наблюдается чрезмерная активация свободнорадикальных процессов, которые индуцируют перекисное окисление липидов и повреждение ДНК сперматозоидов с образованием 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8OHdG) [44]. Последний обладает высокой мутагенностью и может способствовать новым мутациям, 75% из которых происходит в мужских зародышевых клетках.

Анализ локусов образования 8OHdG в геноме сперматозоидов человека выявил около 9 тыс. областей, уязвимых для окислительной атаки. Хотя поврежденные основания, как правило, распределены по всему геному, определенная область на 15-й хромосоме, по-видимому, является предпочтительной мишенью. Этот локус соответствует области, с которой ассоциировано мужское бесплодие, новообразования, нарушения импринтинга и различные аномальные поведенческие состояния (аутизм, биполярное расстройство, спонтанная шизофрения), связанные с возрастом отца в момент зачатия [45].

С учетом этих фактов, была предложена гипотеза, согласно которой факторы окружающей среды и образа жизни во взаимодействии с другими конкретными условиями вызывают окислительное повреждение ДНК в мужских гаметах, которое инициирует образование мутаций *de novo*, способных оказать существенное влияние на здоровье потомства, включая их фертильность [41].

Новой тенденцией в работах последнего времени является акцент на необходимости обязательного контроля эффектов антиоксидантной терапии и сохранения редокс-потенциала эякулята в физиологических пределах с целью профилактики развития редуکتивного стресса [46; 47]. Мужское бесплодие является едва ли не самой частой формой патологии, при которой назначаются антиоксиданты (АО). По данным кокрейновского метаанализа, результаты такого лечения не всегда удовлетворительны и не поддаются однозначной интерпретации [48]. В работу были включены результаты 61 исследования, в

которых приняли участие 6264 бесплодных мужчины в возрасте от 18 до 65 лет, получавших АО. Всего было использовано 18 различных пероральных антиоксидантов. Представлены доказательства их «низкого» или «очень низкого» качества, а также то, что добавление АО у субфертильных пациентов может лишь незначительно улучшить показатели живорождения и частоту беременностей у пар, посещавших клиники по лечению бесплодия.

Вместе с тем, при исключении из анализа исследований со систематическими ошибками, феномен увеличения живорождений не был подтвержден. Авторы советуют информировать супружеские пары, что текущие данные об эффективности АО являются неубедительными вследствие неудовлетворительной отчетности о методах рандомизации, отсутствия данных об исходах клинической беременности, часто неясного или высокого отсева пациентов, а также погрешностей в результатах исследования из-за низкой частоты наступления беременности и рождения живого ребенка, а также небольших размеров выборки. В данном обзоре содержится также ставшая уже дежурной для подобного рода сообщений рекомендация проведения масштабных хорошо спланированных рандомизированных плацебо-контролируемых исследований для уточнения роли и места антиоксидантов в комплексной терапии мужского бесплодия.

Центральным механизмом действия веществ подобного типа постулируется нормализация баланса про- и антиоксидантных факторов эякулята без достаточного теоретического и экспериментального обоснования выбора комбинаций препаратов, их дозировок, режима назначения и дизайна исследования. Низкая эффективность коррекции мужского бесплодия с помощью АО объясняется также малой выборкой пациентов (недостаточной мощностью исследования). Игнорируется и то обстоятельство, что нормальное функционирование сперматозоидов, как и других живых клеток, возможно лишь в строго определенных границах окислительно-восстановительного потенциала,

которые могут быть сравнительно легко преодолены при назначении антиоксидантов в неадекватных дозах [49; 50].

Понимание молекулярных основ мужского бесплодия в настоящее время невозможно без использования т.н. «омиксных» технологий нового поколения, благодаря которым стала возможной разработка и внедрение в клиническую практику целого ряда диагностических и терапевтических биомаркеров мужского бесплодия [51]. Актуальность метаболомики для прогнозирования мужской фертильности подтверждается наблюдением о том, что сперматозоиды метаболизируют широкий спектр соединений, которые тесно связаны с сигнальными путями, участвующими в их подвижности, капацитации, гиперактивации и акросомной реакции [52]. Для определения клеточного фенотипа и его нарушений метаболомика считается более точной, чем транскриптомика или протеомика, поскольку метаболиты, присутствующие в клетке, предоставляют информацию о всей совокупности процессов, происходящих после экспрессии генов и трансляции мРНК.

Ряд исследований был посвящен роли эпигенетических изменений, включая метилирование ДНК, в сперматогенезе и бесплодии [53; 54]. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что степень метилирования ДНК сперматозоидов коррелирует с изменениями эякулята. Установлены дифференциально метилированные регионы нескольких генов, сопряженные с репродуктивной дисфункцией. Частой находкой при мужском бесплодии было aberrантное метилирование ДНК генов MEST и H19 в импринтированных генах и MTHFR в не импринтированных генах. Эти и другие дефектные метки могут потенциально использоваться в качестве полезных инструментов для оценки мужского бесплодия [55].

Другому эпигенетическому механизму регуляции экспрессии генов, реализуемому посредством микроРНК на посттранскрипционном уровне, также принадлежит заметная роль в патогенезе мужского бесплодия. МикроРНК обнаружены почти во всех тканях и жидкостях организма человека, они выделены

из образцов эякулята [56]. МикроРНК модулируют физиологические процессы посредством сайленсинга генов. Эти молекулы, благодаря специфическому взаимодействию с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) целевых мРНК, приводят к ингибированию трансляции и/или деградации последних. Измененные уровни микроРНК ассоциируются со снижением количества, подвижности и аномальной морфологией сперматозоидов [57].

Одной из наиболее изученных микроРНК, имеющих отношение к репродукции, является miR-34. В исследовании, в котором сравнивались образцы эякулята с нормозооспермией и различными вариантами патоспермии, было показано, что miR-34b-5p, а также miR-34c-3p и miR-34b-3p были значительно менее экспрессированы в образцах спермы пациентов с олигозооспермией [58]. При сравнении образцов спермоплазмы фертильных и бесплодных мужчин был обнаружен септет микроРНК, который снижен при азооспермии, а в образцах пациентов с астенозооспермией они были повышены [59]. Этими микроРНК были miR-34c-5p, а также miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p и miR-513a-5p.

Отмечено также, что три пары – hsa-miR-942-5p/hsa-miR-1208, hsa-miR-296-5p/hsa-miR-328-3p и hsa-miR-139-5p/hsa-miR-1260a экспрессированы при астенозооспермии, тератозооспермии, олигозооспермии и показывают дифференцированные паттерны экспрессии у этих пациентов по сравнению с контрольными образцами [56]. Таким образом, в регуляцию сперматогенеза вовлечено более 20 типов микроРНК, что предопределяет сложность интерпретации полученных результатов и их клинического применения. Эти микроРНК рассматриваются как потенциальные биомаркеры бесплодия, а также молекулярные мишени для его целевой терапии.

Определенный прогресс достигнут также в изучении сигнальных и метаболических путей сперматозоидов, связанных с их биоэнергетикой, причастных к нарушению фертильности [19, 60]. Выявлено семь основных путей, дифференциально экспрессированных в сперматозоидах фертильных и

бесплодных мужчин. Показано, что белки метаболизма глюкозы и цикла трикарбоновых кислот высоко экспрессированы у здоровых мужчин и, напротив, были дефектными у бесплодных пациентов. Авторы предположили, что дефекты белков, связанных с энергетическим метаболизмом сперматозоидов, могут быть универсальной причиной бесплодия независимо от его типа.

Особую группу составляют мужчины с тяжелыми формами идиопатического бесплодия и повторными неудачными исходами процедуры ИКСИ. Резистентность к терапии у таких индивидов нередко связана с дефицитом фосфолипазы С дзета сперматозоидов (PLCz), критически важного фактора успешного оплодотворения, ответственного за активацию ооцитов [61; 62]. Этот фермент, запускающий процесс высвобождения ионизированного кальция в ооците, может практически отсутствовать у отдельной категории бесплодных пациентов.

Доказано, что в нормальных сперматозоидах белок PLCz концентрируется в экваториальной области их головки. Фермент гидролизует связанный с мембраной липид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на два продукта: диацилглицерол, инициирующий сигнальный путь через протеинкиназу С, и инозитолтрифосфат, которые обеспечивают необходимый уровень колебаний концентрации ионов кальция для активации ооцитов. Анализ фосфолипазы С дзета является надежным диагностическим инструментом скрининга пациентов для последующего назначения искусственной активации ооцитов [63].

В настоящее время названо также множество т.н. новых биомаркеров мужской фертильности, диагностическая и прогностическая значимость которых подлежит дальнейшему уточнению [64; 65; 66]. К ним можно отнести различные компоненты семенной плазмы: белок теплового шока A2 (HSPA2); белок 101, экспрессируемый семенниками (TEX101); белок внеклеточного матрикса 1 (ECM1); убиквитин; белок акросомальных везикул 1 (ACRV1); антитела к простатическому специфическому антигену (PSA Antibodies); простагландин D-синтаза липокалинового типа (L-PGDS); супероксиддисмутаза (SOD); мелатонин;

гомоцистеин; галектин-3; фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF); фибронектин (FN1); фактор стромальных клеток α (SDF-1 α); богатый цистеином секреторный белок 2 (CRISP2); лептин, адипонектин, грелин и др.

Конкретная роль в мужской репродукции абсолютного большинства названных кандидатов в биомаркеры инфертильности окончательно не определена и подлежит дальнейшему изучению. Предпринимаются попытки систематизации большого массива полученных данных по различным аспектам этой проблемы с акцентом на поиске информативных комбинаций отдельных анализов различного генеза с использованием новейших достижений и возможностей современной фундаментальной науки.

Так, Lazzarino G. и др. [67] при анализе метаболического профиля семенной плазмы выделили группу низкомолекулярных водо- и жирорастворимых соединений, связанных с антиоксидантной защитой, окислительным и нитрозативным стрессом, пуриновым, пиримидиновым, энергетическим обменом, уровни которых значительно отличались у фертильных доноров и бесплодных мужчин. На основе этих данных было предложено рассчитывать т.н. кумулятивный индекс (*Biomarker Score*), который позволяет с высокой степенью достоверности дифференцировать фертильных пациентов от бесплодных как с патоспермией, так и, с оговорками, без аномалий спермограммы.

Наряду с этим, перспективным признается и скрининг одиночных индикаторов идиопатического бесплодия. Одним из таких уникальных белков является шаперон HSPA2, образующий совместно с арилсульфатазой А (ARSA) и молекулой адгезии сперматозоидов 1 (SPAM1) мультимерный комплекс, обязательный компонент, вовлеченный во взаимодействие между сперматозоидом и зоной пеллюцида [27]. Этот комплекс в целом и шаперон в частности весьма чувствительны к действию продуктов пероксидации, например, 4-гидроксиноненаля, который индуцирует диссоциацию HSPA2 от кошаперона BAG6, медиатора его стабильности в мужских половых клетках с последующим убиквитинилированием и деградацией [68]. Анализ HSPA2 семенной плазмы

является полезным не только для оценки состояния сперматогенеза, особенно при криптозооспермии, но и может использоваться как биомаркер, предсказывающий успех лечения бесплодия, включая исходы ВРТ.

Углубленный анализ механизмов эволюции сперматогенеза на уровне транскриптома яичек показал, что темпы их развития в филогенезе как на фенотипическом, так и на молекулярном уровне отличались крайней неравномерностью [69]. Ускоренная фиксация изменений экспрессии генов, аминокислотных замен и появление новых генов были характерны для поздних стадий сперматогенеза. Примечательно, что большинство генов, экспрессирующихся на поздних стадиях сперматогенеза, связано с бесплодием. В частности, речь идет о консервативном гене с ключевыми сперматогенными функциями TEX11 и его продукте, белке 11, экспрессируемом семенниками, а также более лабильном PI4KB, кодирующем 1-фосфатидилинозитол-4-киназу с ее ролью в фосфатидилинозитол-опосредованной сигнализации.

Таким образом, молекулярно-генетические аспекты мужского бесплодия очень сложны, о чем свидетельствует причастность к процессу сперматогенеза более 2 тыс. генов, любой из которых потенциально может стать мишенью (объектом) для диагностических тестов [70]. Одна из основных проблем современной андрологии заключается в идентификации уникальных индикаторов – генов и/или их продуктов, ассоциированных с инфертильностью. Стратегически правильного диагноза можно достичь, разработав и используя панель белковых/нуклеиновых биомаркеров с высокой специфичностью для верификации реального статуса оплодотворяющей способности спермы [66, 71].

1.2. Структурно-функциональные особенности митохондрий сперматозоидов при мужском бесплодии

Сперматогенез – сложный процесс пролиферации и дифференцировки мужских половых клеток, является основой мужской фертильности. В семенных канальцах тестикул сперматозоиды постоянно образуются из

сперматогониальных стволовых клеток посредством стереотипной последовательности митотических и мейотических делений. Внутри семенных канальцев, которые представляют собой функциональные единицы яичка, этот сложный процесс массовой клеточной пролиферации и трансформации приводит к образованию гаплоидных сперматозоидов из диплоидных сперматогониальных стволовых клеток.

Выживание и приспособление сперматозоидов во многом обеспечивается благодаря поддержанию равновесного состояния ключевых процессов, протекающих в их митохондриях.

Митохондрия – сложная субклеточная динамическая органелла с двуслойной мембраной. Основная биологическая функция митохондрии заключается в энергообеспечении клеток, в том числе сперматозоидов, путем окислительного фосфорилирования с образованием молекул АТФ. В мужской репродуктивной системе функции митохондрий не ограничиваются только энергообеспечением сперматозоидов, но и затрагивают важные процессы производства и воспроизводства гамет, пролиферацию зародышевых клеток, митотическую и эпигенетическую регуляцию, апоптоз и гибель клеток [72; 73].

Энергетическое обеспечение сперматозоидов: процессы, субстраты и дисфункция

Роль и место митохондрий в биоэнергетике мужских гамет активно изучается [19, 25; 74]. Синтез АТФ в сперматозоидах млекопитающих осуществляется двумя путями: в процессе гликолиза и тканевого дыхания. АТФ, необходимый для подвижности сперматозоидов, образуется преимущественно в митохондриях.

Сперматозоиды млекопитающих эволюционировали под непрерывным давлением естественного отбора, что привело к их сильно поляризованной и эффективной конструкции. Важнейшим принципом организации сперматозоида является компартментализация метаболических путей в его различных областях [69]. Хотя ограниченное расположение митохондрий в средней части является

наиболее известным примером этой конструкции, ориентация ферментов гликолиза вдоль фиброзной оболочки заслуживает отдельного рассмотрения. Эволюция вариантов этих метаболических систем позволила им функционировать совместно и согласованно, обеспечивая локализованное производство энергии.

Сперматозоид содержит от 72 до 80 митохондрий [75], образующих трубчатые структуры, которые спирально распределены вокруг аксонемы, формируя среднюю часть. Поскольку жгутик сперматозоида длинный и тонкий, а локация митохондрий ограничена его проксимальной частью, закономерен вопрос, может ли АТФ, полученный при окислительном фосфорилировании, диффундировать через весь жгутик для эффективной поддержки активности аксонемы.

В гаметях некоторых животных, например, морского ежа, диффузия АТФ вдоль жгутика происходит благодаря челночному механизму с участием креатинфосфата, который обеспечивает оптимальное соотношение АТФ/АДФ благодаря дуэту креатинфосфат/креатин. Однако в сперматозоидах млекопитающих отсутствует или содержится небольшое количество креатинфосфата и других фосфагенов, что делает маловероятным значимое участие этого челнока в транспорте АТФ в аксонему. Показано также, что сперматозоиды мышей с нокаутом гена митохондриальной креатинкиназы демонстрировали сходные стереотипы подвижности с контрольными образцами дикого типа [76].

Эти и другие факты явились основанием для рассмотрения процесса окислительного фосфорилирования как не единственного «поставщика» макроэргов в сперматозоиде. Анаэробное окисление глюкозы (и фруктозы) – гликолиз, обеспечивает оптимальный уровень внутрифлагеллярной концентрации адениловых нуклеотидов в дистальной части жгутика. Важно, что в качестве субстратов гликолиза при необходимости могут использоваться моносахариды, образованные в ходе глюконеогенеза, для стимуляции которого используется

АТФ митохондриального происхождения, т.е. гликолиз и тканевое дыхание в сперматозоиде метаболически и пространственно тесно связаны [77].

Основным субстратом метаболизма мужских гамет, особенно зародышевых клеток, на протяжении всего их развития, является лактат [78]. Он поступает из клеток Сертоли и используется развивающимися зародышевыми клетками в качестве основного энергетического субстрата. Помимо этого, лактат оказывает антиапоптотическое действие на всех этапах сперматогенеза. В зрелых сперматозоидах молочная кислота инициирует тканевое дыхание и стимулирует двигательную активность благодаря трансферу в митохондрии, где она быстро окисляется [79]. Именно поэтому лактат является оптимальным субстратом для сперматозоидов даже при наличии в них глюкозы и фруктозы.

Детальный анализ аспектов биоэнергетики [80] позволил обобщить результаты исследований, выполненных в разных лабораториях и сделать заключения о том, что, во-первых, и гликолиз и тканевое дыхание важны для успешного оплодотворения; во-вторых, генерация энергии в сперматозоидах может быть ограничена преимущественно процессом либо гликолиза, либо тканевого дыхания, либо их комбинацией в зависимости от условий и наличия соответствующих субстратов; в-третьих, гликолитический путь энергообеспечения преобладает при гиперактивации/капацитации, окислительное фосфорилирование – при созревании/дифференцировке сперматозоидов.

Существует еще один, неканонический, путь эндогенной подпитки сперматозоидов метаболитами, наиболее активный в его хвостовой части. При анализе субклеточного протеома жгутика сперматозоида человека с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии идентифицировано более тысячи белков, большая часть которых ранее не были описаны [81]. Классификация белков по их функциям выявила две основные группы: белки-участники процессов метаболизма и производства энергии, и белки, связанные со структурой жгутика и подвижностью сперматозоидов. Важно, что большую часть метаболического протеома составляют ферменты обмена липидов, в том числе β -

окисления. Были выделены также пероксисомные белки, которые участвуют в окислении длинноцепочечных жирных кислот. Эти результаты были позднее подтверждены методом ПМР-спектроскопии [52].

Анализ полученных сведений с помощью базы данных Reactome показал, что использование жирных кислот в качестве клеточного «топлива» в гаметях более значимо, чем считалось ранее. В пользу этого свидетельствует феномен подавления подвижности сперматозоидов при их инкубации с ингибитором окисления жирных кислот этомоксиром. Эти факты, вопреки ранее принятому мнению, поддерживают гипотезу о том, что сперматозоиды способны получать энергию в митохондриях с использованием эндогенного пула липидов и, таким образом, адаптироваться к экзогенным колебаниям уровня других субстратов [82].

Таким образом, ресинтез АТФ в сперматозоидах базируется на трех процессах (гликолиза, окислительного фосфорилирования, β -окисления) и четырех субстратах (глюкозе, лактате, фруктозе, жирных кислотах). Конкретный вклад указанных процессов и субстратов в общий баланс энергии в сперматозоидах в норме и патологии интенсивно изучается.

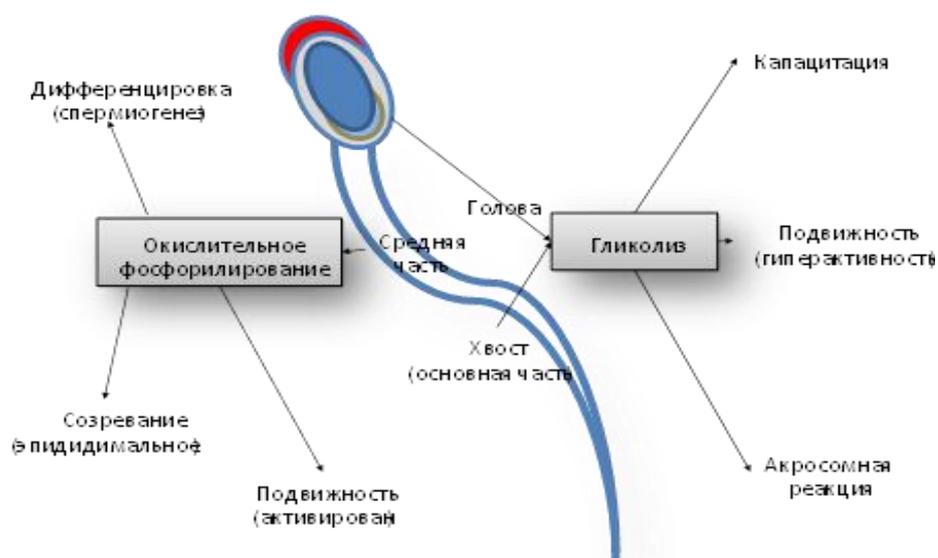


Рисунок 1.1. – Локализация и роль процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза в сперматозоиде

Нарушение структуры и функции ферментных, транспортных и регуляторных белков митохондрий является частой причиной субфертильности [83-87]. Так, у пациентов с повторными неудачными исходами оплодотворения после ИКСИ выявлены множественные дефекты митохондриальных белков: ферментов пируватдегидрогеназного комплекса (дигидролипоилтрансацилазы – DLAT, пируватдегидрогеназы – PDHA) и цикла трикарбоновых кислот (фумаратгидратазы – FH); АТФ-синтазы (дельта-субъединицы F₁-компонента – ATP5F1D и D-субъединицы F₀-компонента –ATP5H); переносчика фосфат-ионов (SLC25A3); транслоказы адениловых нуклеотидов (ANT4); прохибитина 2 типа (PHB2) и др.

Два последних белка, помимо основных функций, вовлечены в процессы регуляции жизненного цикла сперматозоидов. Первый путем индукции апоптоза посредством активации каспаз и деградации ДНК, второй – путем убиквитинилирования митохондрий сперматозоидов и их клиренса в яйцеклетке после оплодотворения. Показано также, что у этой категории пациентов снижена экспрессия аденилаткиназы 1 и аконитазы 2, митохондриальных ферментов, важнейших участников энергетического метаболизма сперматозоидов.

Оценка доступных в открытых источниках транскриптомных данных по всему спектру нарушений мужской репродуктивной функции, включая необструктивную и обструктивную азооспермию, их комбинацию, а также микроделецию Y-хромосомы, для идентификации дифференциально экспрессированных генов и их продуктов, дала возможность верифицировать потенциальные маркерные белки идиопатического бесплодия [86]. Авторами подтверждена патогенетическая значимость пируватдегидрогеназного комплекса и ансамбля ассоциированных с ним белков, 13 из которых вовлечены в энергетический метаболизм (спермоспецифическая лактатдегидрогеназа С, аденилаттранслоказа ANT4, F₀-компонент и альфа-субъединиц F₁-компонента АТФ-синтазы, транслоказа внутренней мембраны митохондрий – TIM4 и др.).

Митохондрии как центр сопряжения процессов окислительного стресса и апоптоза

Апоптозоподобные явления могут быть индуцированы в сперматозоиде человека различными стимулами, не опосредованными рецепторами. Это приводит к инициации окислительного стресса, как было показано, например, для воздействия электромагнитного излучения, криохранения и прямого добавления перекиси водорода [43].

Ключевым событием, способствующим усеченному (митохондриальному) апоптотическому каскаду, является ингибирование сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы [88]. В работе этих авторов подчеркивается доминирующее положение пероксиредоксина-6 (PDX6) в поддержании нативного фосфорилированного статуса фосфатидилинозитол-3-киназы как фактора выживаемости сперматозоидов путем контроля апоптоза.

Важно, что, хотя активные формы кислорода (АФК) можно считать триггером митохондриального пути апоптоза, последний непосредственно связан с окислительным стрессом, создавая порочный круг. Как было продемонстрировано на различных клеточных линиях, высвобождение цитохрома с в цитозоль оказывает прооксидантное действие, поскольку оно вызывает утечку электронов в дыхательной цепи и увеличение концентрации супероксид-аниона кислорода. Это может объяснить факт одновременного появления признаков митохондриальной генерации свободных радикалов кислорода и апоптоза сперматозоидов, связанных с активацией каспазы-9 и каспазы-3 в условиях, способствующих потере трансмембранного потенциала $\Delta\Psi_m$ [89].

Низкие уровни АФК продуцируются сперматозоидами человека и в норме. Они участвуют в таких физиологических процессах как фосфорилирование тирозина и гиперактивация сперматозоидов при оплодотворении [28]. Неконтролируемое нарастание продукции АФК ведет к повреждению мембран и генома сперматозоидов. Этот процесс инициируется гидроксильным радикалом $\text{OH}\cdot$ как наиболее реакционноспособной молекулой благодаря наличию

неспаренного электрона и сопровождается окислением липидов биомембран, аминокислот в белках и углеводов в нуклеотидах [47].

Переокисное окисление липидов (ПОЛ) начинается с дегидрирования мембранных жирных кислот, что приводит к образованию углеводородных радикалов, которые практически мгновенно реагируют с кислородом. Образующийся пероксидный радикал для стабилизации отщепляет атом водорода от соседней жирной кислоты, формируя новый углеводородный радикал, который запускает цепную реакцию в липидах мембран. В результате накапливаются цитотоксические аддукты, такие как малоновый диальдегид, акролеин и 4-гидроксиноненаль, влияющие на текучесть мембран и их способность к слиянию – обязательных условий акросомальной реакции и взаимодействия сперматозоидов с яйцеклеткой [90].

Механизм действия вторичных дериватов свободнорадикального окисления липидов и других органических веществ сводится к их повреждению, в том числе и ферментов дыхательной цепи. Это стимулирует самовоспроизводящийся цикл наработки АФК.

В группу агрессивных форм кислорода входит и оксид азота, пероксинитритные, нитроксильные и нитрозильные соединения. Продукт реакции оксида азота с супероксидом – пероксинитрит вызывает гиперактивацию полиАДФ-рибозилполимеразы с истощением внутриклеточного НАД, нарушением репарации ДНК и экспоненциально нарастающим разрушением сперматозоидов [91].

Хотя процедура ИКСИ позволяет преодолеть последствия повреждений мембранных структур, окисление пуриновых/пиримидиновых оснований и дезоксирибозного остова нарушает целостность ДНК сперматозоидов, ставя под угрозу их жизнеспособность и вклад отцовского генома в развитие эмбриона. В частности, АФК митохондрий могут быстро перемещаться в головку сперматозоида, повреждая молекулы нуклеиновых кислот и белков. Образуются aberrantные основания типа 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (маркер деструкции

ДНК), а также наблюдается модификация других азотистых оснований, индукция поперечных сшивок или одно- и двунитевых разрывов ДНК с последующей деконденсацией хроматина.

Сперматозоиды особенно уязвимы к окислительному стрессу из-за особенностей их клеточной архитектуры и биохимического состава. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембране сперматозоидов повышает их восприимчивость к перекисному окислению. ПНЖК, с одной стороны, необходимы для поддержания текучести мембран сперматозоидов, а с другой – являются мишенью для свободных радикалов из-за низких энергий диссоциации атомов углерода и водорода бисаллильных метиленовых групп, фланкированных двойными связями [41].

Кроме того, в ходе созревания сперматозоиды теряют большую часть своей цитоплазмы, которая содержит антиоксидантные ферменты. Хотя семенная плазма и субклеточные компартменты гамет содержат пероксиредоксины, обеспечивающие эффективную защиту от АФК, сперматозоиды бесплодных мужчин демонстрируют низкий уровень PDX1 и PDX6 с высокой степенью окисления тиолов [88].

Семенная плазма также содержит неферментативные соединения с антиоксидантной активностью, включая аскорбиновую кислоту, глутатион, альбумины, α -токоферол, каротиноиды, карнитин, аминокислоты, флавоноиды которые осуществляют свою активность с помощью двух основных механизмов.

Они могут, во-первых, химически нейтрализовать свободные радикалы; а во-вторых – окисляться подобно альбумину. Более того, хелаторы металлов семенной плазмы, такие как лактоферрин, трансферрин и церулоплазмин, также способны блокировать генерацию АФК. Однако во время прохождения придатка яичка и в женских половых путях сперматозоиды лишены семенной плазмы и ее антиоксидантных факторов. Это делает их уязвимыми к окислительному стрессу, особенно при наличии инфекций половых путей [92].

В дефектных сперматозоидах на определенном этапе их дифференциации активируется процесс саморазрушения, а свободные радикалы выполняют роль триггера перепрограммирования клеточного цикла и «переключения» апоптоза на некроз [93]. Эти данные явились предпосылкой гипотезы о том, что окислительное разрушение зрелых сперматозоидов АФК-вырабатывающими незрелыми сперматозоидами во время их миграции из семенных канальцев в придаток может быть одной из основных причин мужского бесплодия. Важнейшая роль в управлении первичными каскадами элиминации герминативных клеток принадлежит митохондриальному дыханию и сопряженным с ним процессам аэробного окисления глюкозы и синтеза АТФ. Гипоксия, с неизбежным снижением уровня АТФ, подавляет апоптоз сперматозоидов и индуцирует в них некротические явления.

Митохондрии и окислительно-восстановительный гомеостаз

Митохондрии являются центром многочисленных метаболических процессов клетки, таких как цикл трикарбоновых кислот, окислительное декарбоксилирование пирувата, окислительное фосфорилирование, окисление жирных кислот, цикл мочевины, биосинтез пиримидиновых нуклеотидов и др. Митохондриальная недостаточность сопровождается изменением окислительно-восстановительного баланса и способности к биохимической адаптации, предрасполагая к тотальным метаболическим изменениям и клеточной патологии. Интактные митохондрии – важнейшее условие размножения млекопитающих, поскольку дисфункция митохондрий гамет связана с субфертильностью и бесплодием [94-95].

Особое положение в регуляции редокс-состояния клеток и тканей занимают НАД-зависимые белки сиртуины [29]. Семейство сиртуинов состоит из семи членов, три из которых (SIRT3-5) расположены в митохондриях. Они катализируют НАД-зависимое деацелирование и АДФ-рибозилирование митохондриальных белков, модулируя экспрессию генов и активность ферментов, участвующих в окислительном метаболизме и реакциях на стресс.

Митохондриальные сиртуины действуют синергично или антагонистично в зависимости от конкретной ситуации для защиты клеток от экстремальных воздействий и сопряженных метаболических аномалий. Большинство исследований сосредоточено на их роли в женской репродукции, в которых получены доказательства, что SIRT3 повышает выживаемость ооцитов и ранних эмбрионов, защищая яичники от стрессовых состояний. Также была продемонстрирована связь между нарушением передачи сигналов сиртуинами и дисбалансом про- и антиоксидантных систем в яичках.

Как ключевые митохондриальные регуляторы, НАД-деацетилазы и полиАДФ-рибозилполимеразы семейства сиртуинов обеспечивают эффективные метаболические потоки и оптимальный энергетический баланс соматических и половых клеток, а благодаря зависимости своей активности от соотношения НАД⁺/НАДН, эти семейства белков могут служить показателями энергетического статуса органов и тканей [96]. Нами были получены и опубликованы [97] прямые доказательства возможности использования показателей окислительно-восстановительного состояния пиридиновых нуклеотидов эякулята в качестве молекулярных предикторов развития идиопатического мужского бесплодия.

В модельных экспериментах было показано ведущее место изофермента 3β митохондриальной НАД-изоцитратдегидрогеназы (IDH3B) в контроле оптимальной скорости цикла трикарбоновых кислот в сперматозоидах в широком диапазоне значений клеточного редокс-потенциала [98]. Такие интермедиаты цикла трикарбоновых кислот как цитрат, изоцитрат, α-кетоглутарат, сукцинат и фумарат, являются эссенциальными сигнальными молекулами посттрансляционных модификаций основных регуляторных белков и эпигенетического контроля экспрессии генов. Принципиальная задача работ в этой области заключается в том, чтобы понять, можно ли рассматривать системы на основе сиртуинов и других НАД-ассоциированных белков в качестве потенциальных мишеней лекарственных средств при нарушении оплодотворяющей способности сперматозоидов [99].

В последнее время появились свидетельства фундаментального значения величины окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) для коррекции бесплодия антиоксидантами. ОВП является объективным клиническим биомаркером интенсивности окислительного стресса и отражает текущий баланс окислителей и восстановителей в исследуемом образце спермы [100, 101]. Следует подчеркнуть, что расстройства сперматогенеза является самым частым показанием для приема антиоксидантов. По данным клинических исследований, эмпирическая терапия такого рода без параллельного контроля ОВП приводит к неубедительным или отрицательным результатам [102; 103]. Вероятно, это может быть обусловлено, развитием осложнений вследствие переокисленного или, напротив, гиперовосстановленного состояния компонентов семенной плазмы и сперматозоидов.

Yamasaki et al. [104] обнаружили неизвестный ранее феномен зависимости эффективности применения антиоксидантов от уровня ОВП эякулята. По их данным, у пациентов с показателем ОВП более $2,59 \text{ мВ}/10^6$ сперматозоидов, комбинированная антиоксидантная терапия сопровождалась нормализацией параметров спермограммы, в то время как при низком базальном уровне окислительно-восстановительного потенциала применение АО было неэффективным. Эти результаты хорошо согласуются с представлениями о высокой чувствительности гамет к колебаниям редокс-характеристик их окружения.

В целом, оптимальное функционирование сперматозоидов возможно в очень узком диапазоне значений окислительно-восстановительного потенциала, генерируемого митохондриями при биосинтезе макроэргов посредством окислительного фосфорилирования. Митохондрии непосредственно вовлечены и в модуляцию многочисленных процессов на большинстве этапов репродуктивного процесса от сперматогенеза до оплодотворения: дифференцировки сперматогониальных стволовых клеток, развития соматических клеток яичек и стероидогенеза, конденсации/деконденсации ДНК сперматозоидов

в эпидидимисе, гомеостаза АФК как мессенджеров капацитации, акросомальной реакции, взаимодействия с ооцитами и др.

В последние годы сформулировано представление о специфическом сигнальном пути, связанном с фертильностью, дефекты митохондриальных белков которого могут быть причиной идиопатического бесплодия [95]. Однако, независимо от метаболических особенностей, интактные или дисфункциональные митохондрии играют центральную роль в механизмах выживания сперматозоидов как ключевые органеллы, участвующие в реакциях взаимодействия процессов генерации АФК и апоптоза. Понимание молекулярных основ этих явлений необходимо для оптимального выбора комбинации антиоксидантов и других биологически активных соединений, ориентированных на митохондрии, с целью нормализации структуры и функции сперматозоидов, а также репродуктивного потенциала мужчин в целом.

Роль ионов кальция в нарушениях мужской фертильности

Одним из важнейших условий реализации репродуктивной функции млекопитающих является поддержание оптимальных параметров кальциевого гомеостаза митохондрий сперматозоидов [105]. Выступая в качестве основной буферной системы большой емкости для ионов Ca^{2+} , митохондрии участвуют в гомеостазе кальция на уровне целостной клетки. Изменения концентрации митохондриального Ca^{2+} модулируют ключевые клеточные процессы, начиная от аэробного метаболизма (через кальцийчувствительные дегидрогеназы и ферменты цикла Кребса) до высвобождения проапоптотических факторов, включая локальную регуляцию активности мембранных каналов и ферментов [106; 107].

В последние годы идентификация молекулярного механизма, регулирующего накопление и отток митохондриального Ca^{2+} , расширила число патологических и физиологических состояний, которые зависят от гомеостаза кальция в различных компартментах. В настоящее время доказана связь между концентрацией, скоростью и направлениями потоков ионов кальция в гаметах и способностью к активации ооцитов, а также инициации эмбриогенеза [108].

Оптимальная концентрация Ca^{2+} в семенной плазме является одним из важнейших факторов успешного оплодотворения, поскольку этот процесс регулируется ионами кальция и другими сигнальными молекулами. Многие биологические реакции модулируются благодаря системе внутриклеточной рецепции уровня кальция, известной как кальмодулин, активирующий кальмодулинзависимую киназу и фосфатазу для стимуляции экспрессии генов, с последующей активацией цикла протеинкиназы, фосфатазы и фосфодиэстеразы в клетках Лейдига, семенных канальцев и зрелых гамет [109, 110].

Рианодин-чувствительный кальциевый канал (рецептор) – RyR и рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата – $\text{IP}(3)\text{R}$ непосредственно участвуют в регуляции внутриклеточного перераспределения ионов кальция с увеличением его уровня в межклеточном пространстве. Сперматозоиды, в свою очередь, изменяют подвижность в ответ на изменения внеклеточной концентрации Ca^{2+} , цАМФ, рН среды и экспрессии Са-АТФазы [111]. При поступлении сперматозоидов в женский репродуктивный тракт прогестерон стимулирует переход Ca^{2+} из внеклеточного пространства в сперматозоид с его последующей хемотаксической ориентацией и переключением состояния из пассивного ожидания на движения «поворот-и-прямо» с быстрой трансформацией жгутиковой асимметрии [112].

Все последующие события, от капацитации и слияния гамет до активации ооцитов и индукции эмбриогенеза в той или иной степени детерминированы ионами Ca^{2+} и транспортными белками, вовлеченными в его клеточный цикл. При взаимодействии гамет освобождается кальций, запускающий цАМФ-зависимые и тирозинкиназные пути фосфорилирования каскадных систем внутриклеточной передачи сигнала с инициацией активации ооцита [61]. Большое количество Ca^{2+} сосредоточено в головке зрелых сперматозоидов, что облегчает его введение в яйцеклетку. Волна ионов Ca^{2+} , вызванная сперматозоидом, может генерироваться даже тогда, когда яйцеклетки помещены в среду, свободную от Ca^{2+} , что предполагает его высвобождение из внутренних источников.

Осцилляции кальция после слияния гамет инициируют переход яйцеклетки млекопитающих к мейотической метафазе II, называемой активацией яйцеклетки. Ca^{2+} -зависимая сигнализация также играет ведущую роль в развитии ранних эмбрионов: именно частота и амплитуда спайков кальция предопределяет скорость уплотнения бластомеров, образования бластоцисты, успех трансплантации 4-клеточных эмбрионов и их последующего развития [113].

Сравнительно недавно было показано, что некоторые варианты мужского бесплодия, в частности, идиопатические формы и/или возрастное угасание фертильности, могут быть обусловлены дефицитом цитратсинтазы, катализирующей превращение лимонной кислоты в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) в митохондриях [84]. Как оказалось, экстрамитохондриальная форма цитратсинтазы, локализованная преимущественно в головке сперматозоидов, непосредственно участвует в формировании первого всплеска уровня ионов Ca^{2+} в ходе активации ооцитов независимо от спермальной фосфолипазы C дзета.

В той же работе при метаболомном анализе сперматозоидов самцов, нокаутированных по цитратсинтазе, обнаружены диспропорциональные изменения уровня интермедиатов ЦТК с убылью цитрата и приростом сукцината, а также резким увеличением содержания НАД^+ и его предшественников с изменением редокс-потенциала митохондрий и перераспределением потока ионов кальция в клетке.

Таким образом, существует необходимость мониторинга уровня Ca^{2+} и его изменений в семенной плазме, сперматозоидах и эякуляте в целом у пациентов с идиопатическим бесплодием, принимая во внимание универсальную роль этого катиона в реализации функции воспроизводства.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материал и методы исследования

В исследование включены мужчины – пациенты клиник вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) репродуктивного возраста, состоявшие в бесплодном браке от 1 года до 8 лет.

Проведена оценка состояния репродуктивной системы мужчин в возрасте 20-45 лет из бесплодных семейных пар, обратившихся в ЛПУ г. Уфы (перинатальный центр, клиники ЭКО). Средний возраст обследованных пациентов составил $27,6 \pm 0,4$ года.

Обследовано 230 мужчин, из них состоящих в бесплодном браке – 170 человек. Группу сравнения составили 60 мужчин, имевших от одного до трёх здоровых детей, с доказанной фертильностью, из числа доноров спермы.

Исследование выполнялось с добровольным информированным согласием в соответствии с требованиями Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Работа с донорами спермы велась в соответствии с требованиями приказа № 67 Министерства здравоохранения Российской Федерации (2003). Контрольная группа была сопоставима по характеристикам выборке инфертильных мужчин.

Критерии исключения из числа обследованных мужчин:

- эректильная функция по шкале МИЭФ (международный индекс эректильной функции) менее 10 баллов;
- генетические аномалии;
- острые и хронические воспалительные процессы специфической и неспецифической этиологии яичек и их придатков;
- оперативные вмешательства в области пахового канала, сосудов яичка и мошонки;
- варикозное расширение вен семенного канатика;

- хронический алкоголизм, курение больше одной пачки в сутки;
- перенесенный эпидемический паротит в анамнезе;
- доказанные иммуногенные факторы инфертильности;
- доказанная репродуктивная форма патологии у супруги обследованного мужчины;
- генетические аномалии у супруги;
- участие в других клинических исследованиях в течение последнего месяца до настоящего исследования.

Критериями включения пациентов в настоящее исследование явились:

- отсутствие беременности у супруги обследованного мужчины более 1 года при регулярной половой жизни без применения контрацепции;
- возрастной диапазон супруги от 18 до 45 лет;
- проживание супругов в данном регионе не менее 3-х лет.

В соответствии с критериями включения/исключения была сформирована группа наблюдения из 170 соматически здоровых мужчин (основная группа), однородная по материально-бытовым условиям, обеспеченности медицинской помощью, продолжительности проживания в данном регионе, а также социальному положению.

У всех пациентов было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование с анализом эякулята. Анализ спермограммы выполнен в соответствии с протоколом Всемирной организации здравоохранения (2010) [114] и с использованием отечественных руководств по лабораторной диагностике. Данный протокол исследования включает определение таких параметров, как объем и рН спермы, количество, подвижность и морфология сперматозоидов.

Все спермиологические исследования выполнены в условиях одной лаборатории по стандартизованному протоколу. Лабораторное исследование эякулята включало определение его физико-химических свойств и клеточного состава. Каждому обследуемому была дана письменная инструкция по получению эякулята. Период воздержания составил в среднем 2-3 суток. Эякулят получали

путем мастурбации в чистую стерильную пластиковую емкость с широким горлышком. На контейнере указывали идентификационный номер пациента, дату и время получения эякулята. Доставка биоматериала в лабораторию происходила в течение 1 часа при температуре не ниже 20°С и не выше 40° С. Хранение биоматериала осуществляли в термостате при 37° С. Анализ спермы проводили через 30-60 мин после эякуляции и полного разжижения коагулята.

Микроскопию спермы осуществляли при большом увеличении (объектив 40×, окуляр 10×). Количество сперматозоидов считали в камере Горяева в 5 больших квадратах. Подвижность сперматозоидов оценивали при микроскопии нативного препарата спермы во второй половине камеры Горяева под увеличением 40×10, при температурном режиме 20-24°С и исследовали не менее 200 клеток.

При микроскопии эякулята сначала подчитывали количество сперматозоидов, обладавших быстрой и линейной прогрессивной подвижностью, т.е.двигающиеся активно (категория А), и сперматозоиды с медленной линейной и нелинейной прогрессивной подвижностью (категория В). Подсчёт производили по всей поверхности камеры Горяева, полученный результат выражали в %. На следующем этапе учитывались сперматозоиды с непрогрессивной подвижностью, т.е. плавающие по кругу небольшого радиуса (категория С), в последнюю очередь считали неподвижные сперматозоиды (D).

Оценка структуры сперматозоидов проводилась после окрашивания препаратов гематоксилин-эозином при последовательном подсчёте не менее 200 клеток. Полученный результат выражали в процентах с учетом соотношения измененных и неизменных форм сперматозоидов.

В качестве дополнительного критерия качества эякулята определяли индекс тератозооспермии, который отражает среднее количество дефектов на один аномальный сперматозоид (TZI – teratozoospermia index). Индекс тератозооспермии, несмотря на то, что он не относится к основным критериям оценки качества эякулята, активно применяется в сперматологии в связи с

широким распространением технологий ВРТ. В норме показатель TZI находится в пределах от 0 до 1,6.

Взятие крови из локтевых вен обследуемых проводилось в утренние часы в период между 8 ч 00 мин и 10 ч 00 мин натощак по стандартной методике. Сыворотку крови до исследования замораживали и хранили в низкотемпературном холодильнике “Grönland” (Германия) при температуре -30°C не более 6 мес.

Семенную плазму получали путем центрифугирования при 400 об/мин в течение 20 мин, исследуемые образцы хранили при температуре минус 80°C не более 3 месяцев.

2.2. Биохимические методы исследования спермы

О метаболическом статусе семенной плазмы и сперматозоидов судили по окислительно-восстановительному потенциалу пиридиновых нуклеотидов, т.е. по соотношению $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$, которое рассчитывали исходя из молярных концентраций лактата и пирувата. Содержание лактата в семенной плазме определяли с помощью спектрофотометрического метода (CitricScreen, BioScreen). Длина волны измерения – 390-410 нм. Уровень концентрации пирувата оценивали в сопряженной реакции с использованием фермента ЛДГ (Sigma-Aldrich).

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

Уровень цАМФ измеряли с использованием набора для его прямого определения (AMP-ELISA, Enzo Life Sciences/Biomol, Farmingdale, NY). Такой анализ имеет высокую чувствительность до 1 пмоль цАМФ. Для каждой серии анализов была построена стандартная кривая. Концентрации цАМФ были получены путем интерполяции в соответствии с рекомендациями производителя.

Содержание АТФ в семенной жидкости определяли биолюминесцентным методом с использованием системы люциферин/люцифераза (ENLITEN Luciferase/Luciferin Promega Corp). Метод основан на способности люциферазы катализировать реакцию окисления D-люциферина в присутствии ионов магния, кислорода и АТФ до оксилуциферина с выделением кванта света. Интенсивность свечения была прямо пропорциональна содержанию АТФ в анализируемом образце.

Активность ферментов и содержание субстратов энергетического обмена оценивали с помощью стандартных диагностических наборов отечественных производителей колориметрическими методами на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+.

Для оценки состояния про- и антиоксидантных систем эякулята определяли уровень гидропероксидов липидов, карбонилированных белков и ТБК-реагирующих продуктов с использованием стандартных методик. Общую активность антиокислительных систем в спермоплазме определяли колориметрическим методом с помощью тест-набора "Total antioxidant status" (Randox Laboratories) при 600 нм.

Интенсивность свободнорадикальных процессов в эякуляте, а также антиокислительную активность биологически активных добавок в модельных системах, генерирующих АФК, оценивали методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ) с использованием хемилуцинометра LKB-Wallac 1256 (Wallac Oy/PerkinElmer®, Финляндия) как описано в работе [115].

Для оценки влияния исследуемых образцов БАД на свободнорадикальные процессы их добавляли в **модельную систему №1**, генерирующую АФК, с последующей регистрацией Fe^{2+} -индуцированной ХЛ. Образование АФК инициировали введением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа. Конечная концентрация $FeSO_4$ в среде инкубации составляла 2,5 мМ. Реакция сопровождалась ХЛ, которая усиливалась в присутствии люминола. Запись свечения проводили в течение 5 минут. При оценке Fe^{2+} -индуцированной ХЛ

определялись величина спонтанного свечения и продолжительность латентного периода от момента введения ионов железа до начала развития медленной вспышки. Оценивалась также амплитуда быстрой и медленной вспышки. Об интенсивности ЛЗХЛ судили по светосумме и максимальной амплитуде свечения, которые соответствовали скорости образования АФК.

Антиокислительную активность БАД в условиях, близким к процессам ПОЛ в биологической среде, тестировали при их добавлении к липидам, полученным из куриного желтка, содержащего липопротеиновые комплексы, аналогичные липидам крови (**модельная система №2**). Яичный желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, гомогенизировали, содержание белка доводили до 1 мг/мл. Далее отбирали 20 мл смеси, ХЛ инициировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа, что сопровождалось окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов.

2.3. Молекулярно-генетические исследования спермы

Тотальную геномную ДНК, содержащую и ее митохондриальную фракцию, выделяли из спермы с помощью набора реагентов для определения малых количеств ДНК QIAamp DNA Micro Kit. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивалась путем измерения оптической плотности с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Определение генотипов полиморфных локусов в гене митохондриального цитохрома В, а также в гене белка репарации ДНК XRCC1 осуществлялось с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. Анализ аллельной дискриминации проводили с использованием прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). Результаты каждой аллельной дискриминации были проанализированы с использованием программного обеспечения CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad).

Для выделения тотальной ДНК и анализа ее полиморфных локусов был использован нативный эякулят.

Методика выделения ДНК:

1. Лизис клеток: 5 мл спермы смешивают с 30-40 мл лизирующего раствора и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 20 мин при температуре +4°C. При большом количестве осадка на дне пробирке, данную процедуру повторяют дважды.

2. Ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизация клеточного лизата: полученный супернатант сливали в 5% раствор хлорамина. Ядерный осадок ресуспендировали с добавлением 800 мкл готового буферного раствора, содержащего протеиназу К (Soline EDTA). Следующий этап – перенос 2 мл полученного содержимого в эппендорф с добавлением 80 мкл SDS, 20-40 мкл протеиназы К, далее тщательно перемешивали на шейкере в течение 15-20 мин. Инкубацию полученного материала проводили в течение 12 часов при температуре 37°C.

3. Центрифугирование: для удаления денатурированных белков и их фрагментов. После 12-часовой инкубации добавляли 800 мкл забуференного фенола, тщательно перемешивали, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут, добавляли 1000 мкл хлороформ-изоамилового спирта и повторно центрифугировали. Полученный гомогенат промывали 96% этиловым спиртом.

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

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

2.4. Статистические методы анализа результатов исследования

При проведении статистической обработки фактических данных вычисляли среднее значение и стандартное отклонение, результаты представлены в виде $M \pm SD$. Критерий Стьюдента t применялся для сравнения показателей между двумя группами. Корреляционный тест Пирсона и линейная регрессия были использованы для анализа взаимосвязи между параметрами спермы и биохимическими показателями. Взаимосвязь между тремя группами оценивалась с помощью анализа ANOVA и Tukey post hoc. Статистическая значимость была установлена на уровне $p \leq 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 9.0 (Stat Soft, Inc., США).

При попарном сравнении частот мутаций в группах больных и здоровых лиц использовался критерий χ^2 (P) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов odds ratio (OR). В случае наличия достоверных различий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI95%). Статистически значимыми считали различия $p < 0,05$.

Основные этапы исследования выполнены на базе кафедры патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем научно-технологического парка биомедицины Сеченовского университета, Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИЦ РАН), ООО Медицинский центр «Семья» (г. Уфа).

ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

3.1. Особенности обследованных пациентов

Обследовано 170 практически здоровых и сексуально активных мужчин репродуктивного возраста от 20 до 45 лет, обратившихся в клиники ЭКО по поводу отсутствия беременности у партнёрши (таблица 3.1). Средний возраст обследованных составил $27,6 \pm 0,4$ года.

Таблица 3.1 - Распределение обследованных мужчин с бесплодием по возрасту (n=170)

Возраст пациентов (лет)	Обследованные мужчины	
	абс. число	%
20-25	15	9
26-30	67	39
31-35	58	34
36-40	17	10
41-45	13	8

Группу сравнения составили 60 фертильных мужчин (доноры спермы). Обследование проводилось согласно приказу Министерства здравоохранения России от 31.07.2020 г. № 803н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению". Мужчины контрольной группы имели от 1 до 3 здоровых детей и были сопоставимы с бесплодными мужчинами по возрасту, материально-бытовым условиям, экстрагенитальной патологии и социальному положению. Результаты обследования фертильных мужчин представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 - Распределение обследованных фертильных мужчин по возрасту (n=60)

Возраст пациентов (лет)	Обследованные мужчины	
	абс. число	%
20-25	6	10
26-30	18	30
31-35	22	36,7
36-40	9	15
41-45	5	8,3

3.2. Характеристика спермограммы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием

На основании анализа спермограмм было выделено три группы мужчин. Группа I состояла из 60 фертильных доноров. 170 бесплодных мужчин были разделены на две группы (II и III). Во II группу вошли 65 пациентов без изменений параметров спермограммы (нормоспермия). В III группу вошли 105 мужчин с симптомами патоспермии. Полученные результаты представлены в таблице 3.3.

У пациентов второй группы не обнаружено изменений в спермограмме, за исключением концентрации сперматозоидов, которая была статистически недостоверно ниже, чем в группе сравнения. У пациентов третьей группы (патоспермия) установлено статистически значимое снижение количества сперматозоидов, повышение их содержания с морфологическими аномалиями и уменьшение доли прогрессивно подвижных сперматозоидов. Так, концентрация сперматозоидов была значительно ниже (на 46%) по сравнению с контрольной группой. Число морфологически нормальных клеток было также существенно снижено (в 2,6 раза). Эти изменения сопровождалось выраженным угнетением показателя прогрессивной поступательной подвижности сперматозоидов у этой категории пациентов (на 57%).

Наиболее распространенным нарушением оплодотворяющей способности эякулята в инфертильных и субфертильных парах являлось снижение двигательной активности сперматозоидов. Следует отметить, что оценка подвижности сперматозоидов в большой мере субъективна и не может трактоваться однозначно. Статистически значимых различий в объеме эякулята у мужчин во всех группах не выявлено (таблица 3.3).

Таблица 3.3 - Показатели состояния спермы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (средние \pm SD)

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

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

В качестве дополнительного критерия оценки качества сперматозоидов в работе использовали индекс тератозооспермии (ТЗИ), широко применяющийся в

сперматологии. Этот индекс отражает среднее количество дефектов на 1 аномальный сперматозоид и рассчитывается как отношение суммы клеток с дефектами головки, шейки и жгутика, а также с цитоплазматическими каплями, к общему количеству аномальных сперматозоидов. Определение этого индекса рекомендовано для получения дополнительной информации о степени возможных расстройств функции сперматозоидов у мужчин с нормозооспермией и имеет наибольшее значение для прогнозирования частоты наступления беременности при значениях более 1,6 [116].

Установлено, что у мужчин с бесплодием из II и III групп ТЗИ повышен по сравнению с таковыми из I группы (на 17% и 21% соответственно, $p < 0,05$). Статистически значимые различия ТЗИ были обнаружены во всех группах. Однако, несмотря на большое количество патологически измененных сперматозоидов у пациентов третьей группы (патоспермия), достоверных отличий этого показателя с пациентами второй группы (нормоспермия) не обнаружено.

Результаты апостериорного анализа ANOVA и Туки подтвердили наши результаты о существенной разнице в качестве спермы между всеми группами.

Морфологические изменения сперматозоидов у бесплодных пациентов заключались в аномалиях головки, шейки, жгутика и/или в их сочетании, а также в наличии остаточной цитоплазматической капли. Существенное увеличение доли патологических форм сперматозоидов отмечалось у мужчин третьей группы (патоспермия). Обнаружение гамет с резидуальной цитоплазматической каплей является важным диагностическим критерием идиопатического бесплодия, поскольку такой клон клеток характеризуется повышенной генерацией активных форм кислорода (АФК). Неконтролируемое увеличение образования АФК сопровождается повреждением, в том числе, необратимым, мембран и генома сперматозоидов [46].

Среди «круглых клеток» эякулята выявлены лейкоциты, клетки сперматогенеза и простатического эпителия. Число лейкоцитов во всех образцах не превышало 1×10^6 /мл. Достоверных различий содержания лейкоцитов в

эякуляте мужчин всех групп не выявлено. Пациентов со значительным лейкоцитозом эякулята в группу обследования не включали.

3.3. Состояние энергетического обмена семенной плазмы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием

Результаты биохимического анализа показали ряд особенностей, касающихся содержания и распределения метаболитов в семенной плазме (таблица 3.4). Прежде всего, это наличие значительного градиента уровня большинства соединений у доноров спермы и бесплодных мужчин с нормо- и патоспермией. Патоспермия характеризовалась значимым уменьшением содержания ионов кальция в семенной плазме ($p < 0,01$).

Снижение уровня кальция у бесплодных мужчин совпадало с динамикой изменений цАМФ и превосходило их по амплитуде колебаний. Уровень цАМФ у мужчин с идиопатическим бесплодием при патоспермии также значительно снижался ($p < 0,05$).

Концентрация АТФ в спермоплазме у бесплодных мужчин с отклонениями в спермограмме была снижена и составляла 66% от контрольной величины (см. таблицу 3.4 и рисунок 3.1). Учитывая существенную роль аденозинтрифосфата в обмене веществ, этот факт является основанием говорить о прямой или опосредованной связи значительной части метаболических сдвигов при патоспермии с дефицитом макроэргов. При этом, убыль АТФ может быть результатом как усиленного расходования энергии в эндэргонических реакциях, так и нарушения механизмов энергопродукции в результате снижения окислительной активности митохондрий, являющихся главным поставщиком энергии в сперматозоидах.

Поскольку ионам кальция, цАМФ и АТФ принадлежит критически важная роль в формировании и энергообеспечении сигнальных путей, инициирующих и обеспечивающих двигательную активность и оплодотворяющую способность

гамет, представляло интерес выяснение наличия взаимосвязей между этими показателями спермоплазмы и морфофункциональными характеристиками эякулята. Выявлено, что снижение уровня цАМФ прямо коррелировало с уменьшением количества прогрессивно подвижных сперматозоидов ($p < 0,01$), но не с количеством их патологических форм.

Таблица 3.4 - Содержание метаболитов и редокс-состояние пиридиновых нуклеотидов в семенной плазме здоровых мужчин и у пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (средние \pm SD)

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

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

Обнаружена также прямая корреляция между снижением концентраций цАМФ, Ca²⁺ и двигательной активности гамет ($p < 0,005$) в сперме бесплодных мужчин. Тесная корреляция уровней вторичных посредников и двигательной активности сперматозоидов свидетельствует о взаимосвязи молекулярных механизмов нарушения моторной функции гамет и процессов передачи внутри- и межклеточных сигналов.

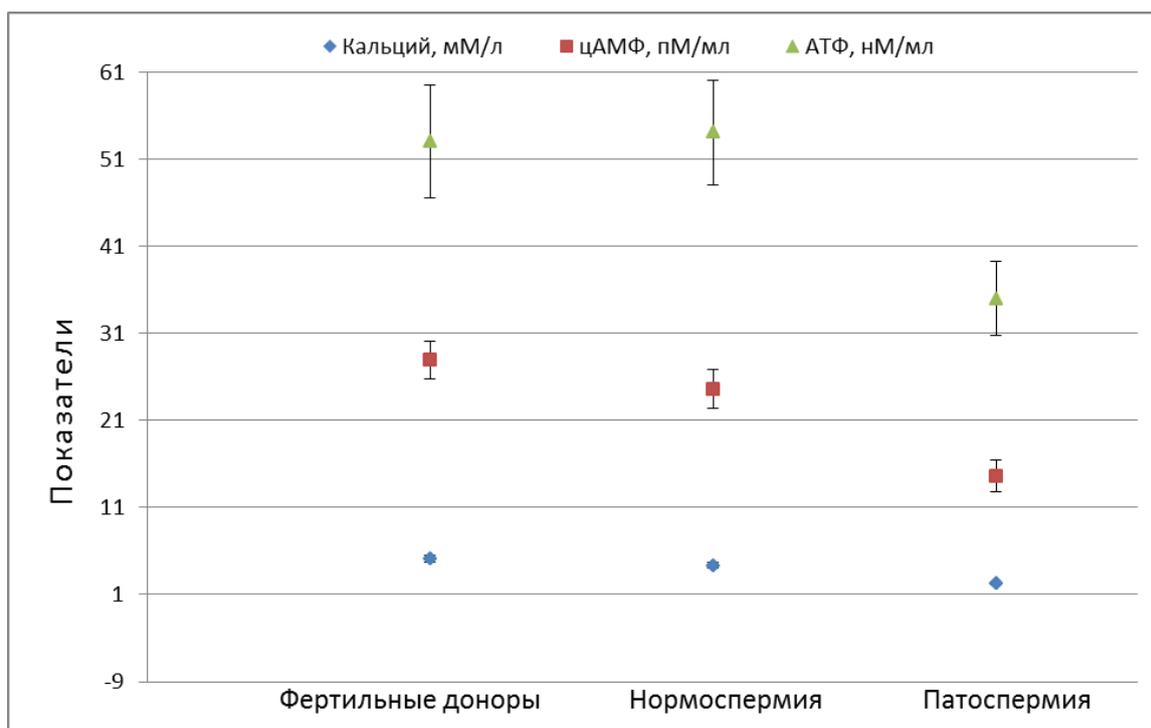


Рисунок 3.1 - Уровни ионов кальция, цАМФ и АТФ в спермоплазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

Уровень кальция также тесно связан с объемом эякулята ($p < 0,001$) у бесплодных мужчин с патоспермией. Наличие такой связи проявляется, в том числе, высокой вариабельностью количества эякулята у этой категории пациентов. В отличие от этого, у всех фертильных мужчин объем эякулята находился в пределах нормы ($>1,5$ мл), что соответствует критериям ВОЗ.

В сопряженной системе лактат/пируват выявлены противоположные изменения их уровней – выявлен его подъем у лактата при синхронном снижении у пирувата. Соотношение лактат/пируват косвенно указывает на окислительно-восстановительное состояние клеток, определенных клеточных компартментов и биологических жидкостей. Существуют две основные молекулярные системы, определяющие окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды. К ним относят окисленные и восстановленные формы никотинамидных коферментов (NAD^+ и $NADH$) и глутатиона ($GSSG$ и GSH). В нашем исследовании редокс-потенциал никотинамидных нуклеотидов $[NAD^+/NADH]$ рассчитывали исходя из молярных концентраций лактата и пирувата (рисунки 3.2 и 3.3).

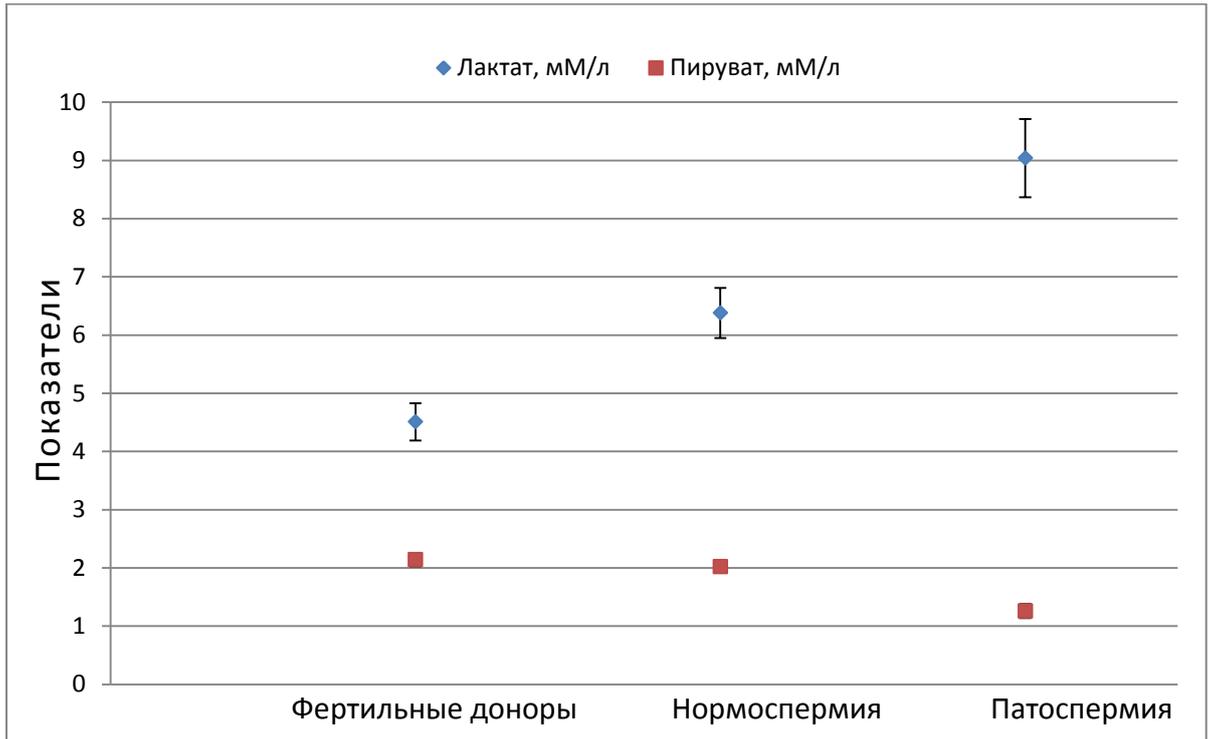


Рисунок 3.2 - Уровень лактата и пирувата в спермоплазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

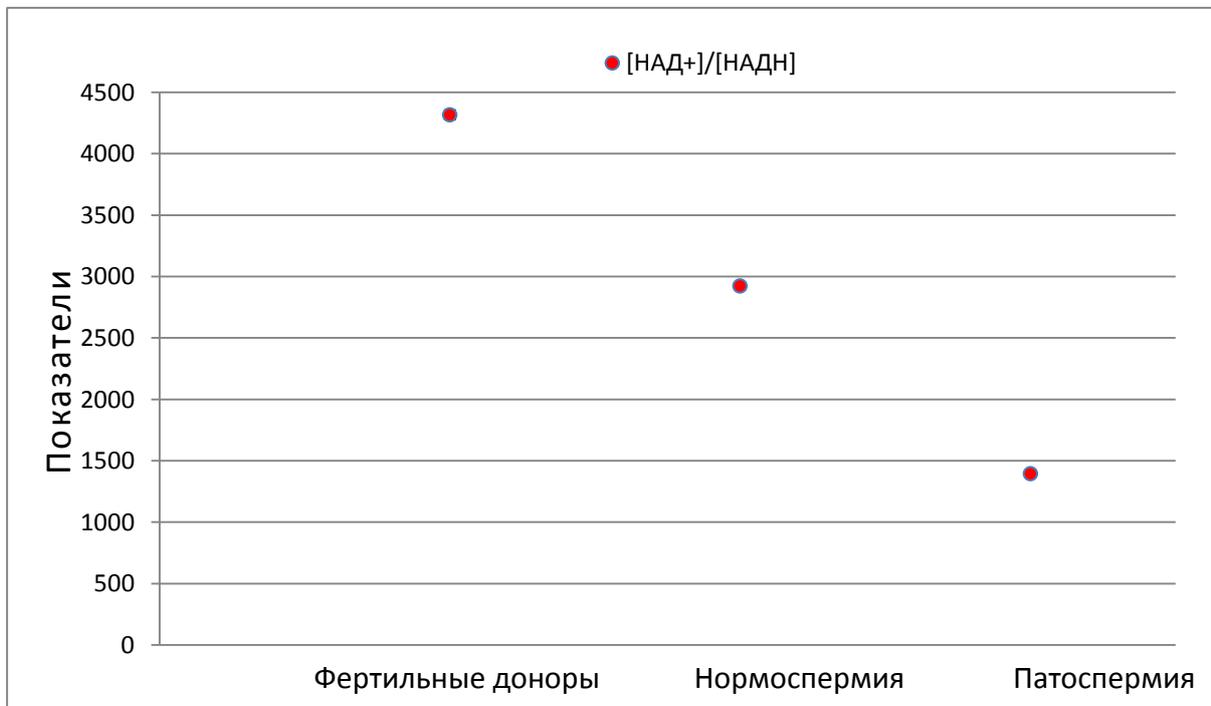


Рисунок 3.3 - Соотношение [НАД⁺]/[НАДН] в спермоплазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

У бесплодных пациентов с нормоспермией и патоспермией наблюдалось статистически значимое снижение показателя соотношения $[NAD^+/NADH]$ – до 67% и 32% уровня фертильных доноров, соответственно. Патоспермия характеризовалась также отрицательной зависимостью между величиной редокс-потенциала никотинамидных коферментов, с одной стороны, и прогрессивной подвижностью сперматозоидов и долей аномальных сперматозоидов, с другой ($r=-0,53$ и $-0,62$; $p<0,005$, соответственно).

Эти данные соответствуют представлениям о роли окислительно-восстановительного статуса никотинамидных коферментов в контроле активности митохондрий, состояния их ионных каналов и степени эпигенетических модификаций хроматина. Это, в свою очередь, детерминирует вероятность инициации апоптоза сперматозоидов, скорость пролиферации и дифференцировки сперматогоний и другие жизненно важные явления в репродуктивных органах [28, 117].

Результаты проведенных исследований послужили предпосылкой для разработки способа диагностики фертильности при идиопатическом бесплодии (патент на изобретение № 2789239), который основан на количественном определении кофермента NAD^+ в эякуляте [118].

Для измерения концентрации NAD^+ был использован колориметрический метод в соответствии с инструкцией производителя (Kit Booklet $NAD/NADH$ Cell-Based Assay Kit, Cayman Chemical, 2017). При значении концентрации NAD^+ в интервале, равном 91-120 нмоль/ 10^6 сперматозоидов, эякулят оценивали как фертильный.

Предложенный способ был применен у 30 фертильных и 65 бесплодных мужчин. Анализ результатов показал статистически достоверные изменения в показателях эякулята и концентрации NAD^+ у обследованных пациентов с учетом их возрастной категории (таблица 3.5). Из таблицы 3.5 видно, что выход основных показателей состояния эякулята за пределы диапазона референтных значений свидетельствует о наличии у мужчины инфертильности.

Таблица 3.5 – Показатели эякулята здоровых мужчин и пациентов с бесплодием в зависимости от их возраста ($M \pm m$)

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

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

Ниже приводятся клинические примеры.

Пример 1.

Супружеская пара Н. обратилась в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы по поводу первичного бесплодия в течение 3 лет. Возраст супруги 26 лет, супруга 31 год. При обследовании эякулята концентрация НАД⁺ составила 91 нмоль/10⁶ сперматозоидов. Такой эякулят оценили как фертильный. При его стандартном лабораторном исследовании не выявлено отклонений от нормы: показатель подвижности гамет составил 51% (категория А - 35%, категория В - 16%); количество сперматозоидов с нормальной морфологией составило 30%, концентрация - 84 млн/мл. У супруги при обследовании выявлен трубно-перитонеальный патогенный фактор бесплодия.

Заключение: у супруги – бесплодие трубно-перитонеального генеза; у супруга – нормозооспермия.

Пример 2.

Пациент Г., 34 лет; супруга М., 30 лет; состоят в бесплодном браке в течение 6 лет. В анамнезе 3 неудачные попытки ЭКО и ЭКО-ИКСИ в различных клиниках ВРТ. При обследовании женщины патологии со стороны репродуктивной системы не выявлено. При изучении эякулята супруга содержание НАД⁺ составило 164 нмоль/10⁶ сперматозоидов. Эякулят оценен как инфертильный. При лабораторном исследовании эякулята не выявлено существенных отклонений его характеристик от нормы: уровень подвижности сперматозоидов составил 48% (категория А - 30%, категория В - 18%); показатель сперматозоидов с нормальной морфологией составил 22%, концентрация - 44 млн/мл.

Заключение. Уровень НАД⁺ в эякуляте у пациента Г. свидетельствует о его инфертильности. Анализ показателей спермограммы не выявил возможных причин снижения оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Приведенные выше примеры демонстрируют, что предлагаемый метод определения НАД⁺ в гаметах позволяет выявить нарушения репродуктивной функции мужчин до исследования спермограммы.

Преимуществами метода является возможность использования его результатов в качестве надежного биомаркера идиопатического мужского бесплодия, предиктора исходов процедуры ЭКО/ИКСИ, а также для первичного скрининга образцов эякулята фертильных доноров спермы.

3.4. Изменение процессов энергопродукции в митохондриях у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием

Считается, что АТФ, необходимый для активных поступательных движений сперматозоидов, образуется преимущественно в митохондриях. При нарушениях

фертильности различными авторами выявлена недостаточность энергообеспечения мужских гамет, обусловленная повышенным расходом и низким синтезом макроэргических соединений (напряжение систем детоксикации, активация транспортных АТФаз для компенсации шунтовых сбросов ионов в поврежденных участках биомембран, патология митохондрий и ферментов биологического окисления и др.) [119].

Вместе с тем, необходимо отметить, что многие аспекты состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в мужской репродуктивной системе при патологии фертильности освещены недостаточно. Как уже упоминалось, развивающийся дефицит АТФ может являться результатом как усиленного его потребления в эндэргонических реакциях, так и нарушения механизмов энергопродукции.

В связи с этим, мы сочли необходимым охарактеризовать окислительную способность митохондрий по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и изоцитратдегидрогеназы (ИДГ), ключевых флавиновых и пиридиновых оксидоредуктаз цикла трикарбоновых кислот, катализирующих окисление ФАД- и НАД-зависимых субстратов (таблица 3.6).

Степень угнетения окислительной дегградации НАД- и ФАД- зависимых субстратов оказалась практически одинаковой (за исключением активности ИДГ при патоспермии) и составляла от 73 до 86% от уровня группы сравнения.

Таблица 3.6 - Активность митохондриальных энзимов СДГ и ИДГ в сперматозоидах здоровых мужчин и у пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии ($M \pm m$)

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

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

Установлено существенно более выраженное снижение активности в гаметах ИДГ при патоспермии: до 42% контрольных величин. Это не противоречит данным о том, что блокада цикла трикарбоновых кислот в сперматозоидах на уровне изоцитрата сопровождается энергетическим дефицитом, нарушением биогенеза акросомы и жгутика с остановкой спермиогенеза [98].

Отметим, что корреляция между содержанием изоцитрата и сукцината и такими характеристиками спермограммы, как количество и морфология гамет, отсутствовала ($p > 0,05$). Однако, при этом выявлена обратная статистически значимая зависимость между активностью ИДГ и СДГ и подвижностью сперматозоидов, что может иметь определенное патогенетическое значение. Сукцинат и изоцитрат, как основные доноры протонов и электронов для ФАД- и НАД-зависимых ферментов, вносят весомый вклад в метаболическую эффективность цитратного цикла. Из этого следует, что ингибирование СДГ и ИДГ может сочетаться со снижением выживаемости сперматозоидов в женском репродуктивном тракте вследствие недостаточности их двигательной активности, предопределенной энергетическим дефицитом.

Приведенные результаты исследования и их трактовка согласуются с мнением других авторов о возможных механизмах изменения энергопродукции в мужских гаметах при инфертильности и могут свидетельствовать о высокой чувствительности и уязвимости процессов окислительного фосфорилирования в органах мужской детородной системы [120].

3.5. Оценка содержания ключевых энергетических субстратов в семенной плазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием

Семенная плазма состоит из большого набора органических и неорганических веществ, необходимых для реализации процесса оплодотворения благодаря созданию оптимальных условий, обеспечивающих подвижность,

жизнеспособность, хемотаксис и трансфер сперматозоидов в женском репродуктивном тракте [121]. В состав спермоплазмы входит лимонная кислота, фруктоза, глюкоза, протеазы, кислая фосфатаза и другие гидролазы, простагландины, коагулирующие элементы и бикарбонаты, выделяемые преимущественно семенными пузырьками.

В семенной плазме имеется высокая концентрации фруктозы, которая используется в анаэробном и аэробном путях генерации энергии в сперматозоидах и непосредственно обеспечивает их прогрессивную подвижность и вязкость эякулята.

Лимонная кислота является незаменимой органической кислотой. Её роль заключается в поддержании рН, регуляции активности гиалуронидазы, а также процессов коагуляции и разжижения спермы. Кроме того, концентрация цитрата в семенной плазме выступает как показатель секреции предстательной железы. Лимонная кислота играет также важную роль в поддержании осмотического равновесия спермы, что влияет на состояние мембран, активность и морфологию сперматозоидов [122].

Информативным маркером состояния энергетического метаболизма эякулята является также уровень в нем глюкозы. Семенная плазма в норме содержит достаточное количество глюкозы, фруктозы и лимонной кислоты, обеспечивающих анаэробный и аэробный пути генерации макроэргов для сперматозоидов. Исходя из этого, нами была определена концентрация этих веществ в спермоплазме у фертильных мужчин и у пациентов с идиопатическим бесплодием (таблица 3.7).

Как видно из таблицы, наибольшие изменения претерпевал уровень глюкозы, который статистически значимо снижался на 48% и 82% от контрольных величин у пациентов с пато- и нормоспермией, соответственно. Это свидетельствует об интенсификации гликолитических процессов в эякуляте в условиях убыли АТФ, снижения энергетической значимости пирувата и других субстратов, т.е. играть компенсаторную роль.

Таблица 3.7 - Концентрация фруктозы, цитрата и глюкозы в спермоплазме здоровых мужчин и у пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

Пациенты (n)	Фруктоза (мМ/л)	Цитрат (мМ/л)	Глюкоза (мМ/л)
Фертильные (n=60)	10,4±2,79	42,16±1,22	0,56±0,07
Нормоспермия (n=65)	9,9±3,25	38,3±1,44*	0,46±0,05*
Патоспермия n=105)	9,6±3,09	36,70±1,65*	0,27±0,03***

*Различия статистически значимы по сравнению с фертильными донорами при $p < 0,05$;

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

В отличие от глюкозы, значительных сдвигов содержания других субстратов энергетического метаболизма в спермоплазме не обнаружено. Концентрация цитрата у бесплодных пациентов снижалась на 10-13% относительно группы сравнения ($p < 0,05$), в то время как уровень фруктозы достоверно не изменялся. По данным других авторов концентрация фруктозы в спермоплазме уменьшалась по мере увеличения количества и подвижности сперматозоидов и наоборот [121, 123].

Слабо выраженная тенденция к снижению в спермоплазме уровня фруктозы у бесплодных мужчин, несмотря на сокращение количества сперматозоидов и их подвижности, обнаруженные в нашем исследовании, может быть связана с умеренным уменьшением её утилизации.

Наши результаты показали также, что концентрация в семенной плазме фруктозы отрицательно коррелирует с количеством и подвижностью сперматозоидов и эта корреляция подтверждает факт ограничения утилизации фруктозы сперматозоидами (таблица 3.8). Коэффициент Пирсона выявил отрицательную корреляцию числа сперматозоидов ($r = -0,467$, $p < 0,01$) и их подвижности ($r = -0,475$, $p < 0,01$) с уровнем фруктозы. В то же время, концентрация цитрата имела положительные корреляции с количеством сперматозоидов

($r=0,458$, $p<0,01$) и их подвижностью ($r =0,446$, $p<0,01$), совпадающим со снижением ее уровня в семенной жидкости (рисунок 3.4).

Таблица 3.8 - Коэффициенты корреляции между показателями подвижности и количества сперматозоидов и содержанием фруктозы и цитрата в спермоплазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

Параметр спермограммы	Аналит	Фертильные доноры	Бесплодные мужчины	
			Нормоспермия	Патоспермия
Подвижность сперматозоидов	Фруктоза	-0,3*	-	-0,475*
	Цитрат	-	-	0,446*
Количество сперматозоидов	Фруктоза	-0,372*	-	-0,467*
	Цитрат	-	-	0,458*

*Корреляция значима при $p<0,01$

В целом, содержание фруктозы и цитрата в спермоплазме, само по себе, не может рассматриваться как релевантный маркер бесплодия. Однако, в сочетании с другими показателями спермоплазмы, например, такими как уровни глюкозы и лактата, могут быть основанием для оценки репродуктивного статуса мужчины.

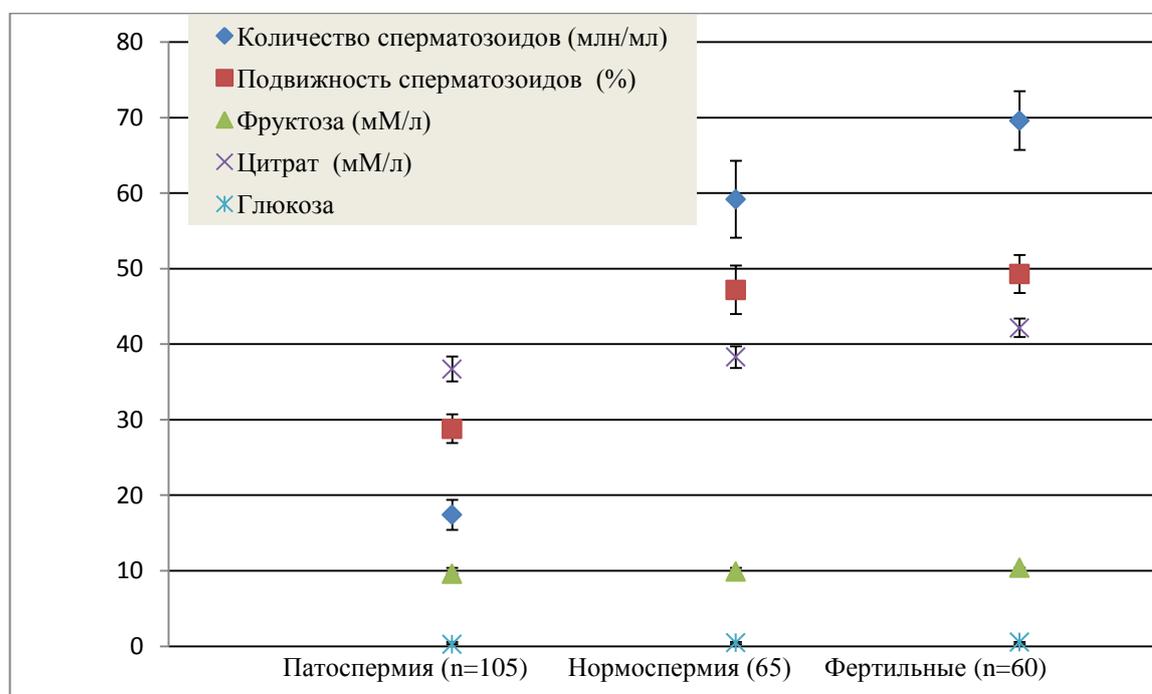


Рисунок 3.4 - Показатели подвижности и количества сперматозоидов, содержания фруктозы, цитрата и глюкозы в спермоплазме у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

Таким образом, фруктоза является эссенциальным источником энергии для обеспечения метаболизма и подвижности сперматозоидов. Её уровень отражает функциональное состояние семенных пузырьков и семявыносящих протоков. Снижение содержания лимонной кислоты в эякуляте дает основания допускать наличие дисфункции предстательной железы. С учетом этих данных, результаты исследования биохимического состава спермоплазмы позволяют объективно оценить функциональный статус придаточных половых желез, которые в значительной степени формируют объем эякулята.

3.6. Изменение активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием

Метаболизм глюкозы необходим для обеспечения активности гамет, а также таких специфических функций, как подвижность и способность к оплодотворению зрелых сперматозоидов.

Гексокиназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа катализируют реакции окисления глюкозы в клетках по двум основным путям: гликолизу и пентозофосфатному циклу. Доказано, что скорость и соотношение интенсивности этих путей метаболизма обеспечивают взаимодействие сперматозоида и яйцеклетки [124].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), катализируя первую реакцию пентозофосфатного цикла с образованием НАДФН+Н⁺, обеспечивает восстановительными эквивалентами многочисленные метаболические процессы, преимущественно синтетические и антитоксические. НАДФН+Н⁺ принимает непосредственное участие в защите мужских гамет от активных форм кислорода.

Гексокиназа (ГК) катализирует фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, используя АТФ митохондриального происхождения. Фермент регулирует метаболические потоки в клетке синхронно с другими ключевыми ферментами дихотомического окисления вплоть до пирувата. Это сопровождается увеличением активности цитратсинтетазы и энзимов ЦТК в

целом, сочетающемся с ускорением транспорта электронов, увеличением соотношения АТФ/АДФ, деполяризацией мембраны и притоком в клетку ионов кальция.

Результаты оценки активности ГК и Г6ФДГ представлены в таблице 3.9. Полученные данные свидетельствуют об интенсификации окислительных превращений глюкозы с преимущественной активацией гликолиза, но не пентозофосфатного цикла. В обеих группах бесплодных пациентов активность гексокиназы статистически значимо увеличивалась на 39-65% в сравнении с фертильными мужчинами, что сочетается со снижением концентрации глюкозы вследствие ускорения её утилизации.

Скорость Г6ФДГ-реакции значимо не изменялась, что может означать ограничение использования апопомического пути для регенерации НАДФН+Н⁺, необходимого источника восстановительных эквивалентов для глутатиона и стабилизации каталазы.

Таблица 3.9 - Активность гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эякуляте здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

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

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

Восстановленный глутатион и каталаза играют важнейшую роль в нейтрализации продуктов липопероксидации, оказывающих необратимый цитотоксический эффект, в том числе и на сперматозоиды с развитием мужского бесплодия. Дефицит Г6ФДГ является наиболее распространенной врожденной аномалией метаболизма, от которой страдают около 400 миллионов человек во

всем мире. Поскольку ген этого фермента расположен на длинном плече X-хромосомы (Xq28.2) и его наследование является рецессивным, заболевание в основном наблюдается у мужчин [125].

Очевидно, что и в нашем случае НАДФН+Н⁺, необходимый для процессов детоксикации окислителей, может продуцироваться в гаметах и другими путями, как это было продемонстрировано в модельных экспериментах *in vitro* с индукцией окислительного стресса, вызванного H₂O₂ [126].

3.7. Динамика показателей состояния системы креатинфосфокиназа/креатин как критерий изменения качества спермы

Активная подвижность сперматозоидов обеспечивается благодаря высоко организованной аксонеме жгутика. Использование энергии жгутиком тесно связано с переносом высокоэнергетических фосфатов от митохондрий к аксонеме, который опосредован креатин/фосфокреатиновым челноком. Креатинфосфат, образующийся при участии креатинфосфокиназы (КФК) из креатина, является источником энергии для быстрой регенерации АТФ.

Активность КФК в спермальной плазме многократно превышает значение этого показателя в сыворотке крови, что свидетельствует о высокой интенсивности метаболизма макроэргических соединений в мужской репродуктивной системе. Вместе с тем, единого мнения о состоянии системы КФК/креатин в эякуляте при бесплодии нет: уровень активности фермента и содержание субстрата, по данным разных авторов, варьируют в широких пределах [127-129].

Настоящий раздел работы посвящен исследованию динамики уровней КФК и креатина в семенной плазме фертильных и бесплодных мужчин (таблица 3.10, рисунок 3.5).

Как видно, содержание креатина в сперме было без статистически значимой разницы между группами, несмотря на отчетливую тенденцию к снижению у

пациентов с патоспермией. Однако активность КФК у них в спермоплазме была существенно выше: более чем в 1,5 раза в сравнении со здоровыми донорами и пациентами с нормоспермией.

Таблица 3.10 - Содержание креатина и активность КФК в спермоплазме здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

Показатель	Фертильные доноры (n=60)	Бесплодие: нормоспермия (n=65)	Бесплодие: патоспермия (n=105)
Креатин, мкмоль/л	791±34,2	761±32,5	726±42,2
КФК, Ед/л	847±48,0	869,2±55,9	1463±95,6 ^{*,**}

Здесь и далее * Различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$

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

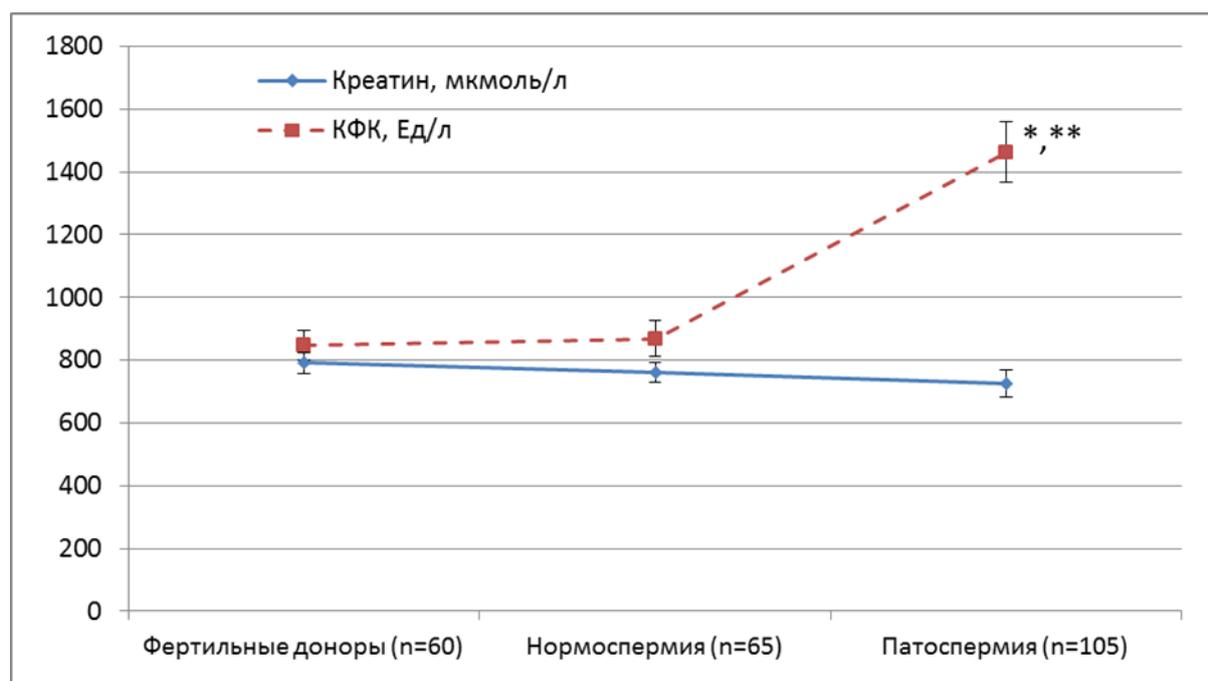


Рисунок 3.5 - Содержание креатина и активность КФК в спермоплазме здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

Уровень спермального креатина в этих группах наблюдения был положительно связан с прогрессивной подвижностью сперматозоидов ($r=0,38$; $p=0,010$ и $r=0,31$; $p=0,024$, соответственно). Это свидетельствует о существенной роли небелковой аминокислоты креатина в оптимальном энергообеспечении

двигательной активности гамет. У пациентов с патоспермией эта связь усиливалась: умеренному дефициту креатина соответствовало существенное ограничение двигательной активности сперматозоидов ($r=0,64$; $p=0,011$).

При этом активность КФК спермоплазмы у фертильных мужчин отрицательно коррелировала с концентрацией сперматозоидов ($r=-0,29$; $p=0,01$), их прогрессивной подвижностью ($r=-0,26$; $p=0,03$) и процентом аномальных сперматозоидов ($r=-0,28$; $p=0,02$). У бесплодных пациентов обеих групп эти связи были менее выражены и не достигали уровня статистической значимости.

Неполное соответствие полученных нами данных о состоянии системы КФК/креатин в эякуляте с результатами других авторов [128, 129, 141-130] может быть обусловлено неоднородностью групп наблюдения, особенностью использованных биохимических методик, применяемых в разных лабораториях, а также, вероятно, дизайном исследования. Так, ни в одной работе по этой тематике не было выполнено детального анализа всех компонентов креатинкиназной системы, включая содержание креатинфосфата и активность изоферментов КФК – ММ и ВВ, локализованных в разных частях зрелых сперматозоидов [130]. Поэтому можно согласиться с рекомендациями авторов цитируемой работы о необходимости, во-первых, комплексного определения всех изоферментов и субстратов этой системы, во-вторых, обогащения рациона субфертильных и бесплодных мужчин такими нутриентами, как креатин и его дериваты, учитывая высокую энергоёмкость спермы.

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

4.1. Мутации гена митохондриального цитохрома В и их роль в развитии мужского бесплодия

Одной из причин мужского бесплодия являются мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) сперматозоидов, приводящие к нарушению их энергообеспечения и подвижности. Митохондриальный геном подвержен частым мутациям и высокому полиморфизму в связи с особенностями его строения, расположения, а также из-за отсутствия рекомбинативной изменчивости, поскольку наследуется строго по материнской линии. Указанные особенности сопровождаются накоплением в сперматозоидах однонуклеотидных полиморфизмов в мтДНК (mtSNP).

В гаметях митохондрии располагаются по периферии их жгутика, поскольку аппарат микротрубочек, из которых состоит жгутик сперматозоида, наиболее энергозатратен. Митохондрия представляет собой органеллу, которая имеет собственный геном, кодирующий 13 белков, с различными внехромосомными кольцевыми и двухцепочечными молекулами ДНК. Митохондриальная ДНК обладает уникальным механизмом субклеточной транскрипции и репликации [131].

Нами проведен анализ трех полиморфных вариантов гена митохондриального цитохрома В у пациентов с бесплодием и у здоровых мужчин с нормальными показателями спермы. Результаты приведены в таблице 4.1.

Как следует из полученных нами данных, замена тимина на цитозин в позиции 15629, приводящая к синонимичной мутации Leu295=, не была обнаружена ни в группах пациентов с различными вариантами бесплодия, ни в группе фертильных мужчин. Исходя из этих результатов, правомерно предварительное заключение, что указанная мутация является очень редкой и не

вносит значимого вклада в развитие мужского бесплодия в регионе Башкортостана.

Таблица 4.1 - Частота распределения различных вариантов мтДНК у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

SNP	Изменения последовательности мтДНК (изменения структуры белка)	Генотипы	Пациенты с нормоспермией, N (%)	Пациенты с патоспермией N (%)	Группа фертильных мужчин	P-value (OR, 95% CI)
rs2835 7373	T15629C (Leu295=)	CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	p>0,05
		CT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
		TT	65 (100%)	89 (100%)	164 (100%)	
rs5272 36194	T15784C (p.Pro346=)	CC	6 (9,23%)	12 (13,5%)	10 (6,1%)	p=0,04* (OR=2,4; 95% CI=0,99- 5,8)
		CT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
		TT	59 (90,7%)	77 (86,5%)	154 (93,9)	
rs2853 506	A15218G (p.Thr158Ala)	GG	2 (3,0%)	3 (3,3%)	4(2,6%)	p>0,05
		AG	0	0(0%)	0(0%)	
		AA	63 (97%)	86 (96,7%)	160 (97,6%)	

* - сравнение фертильных и бесплодных мужчин с патоспермией
 SNP - Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
 Leu – лейцин, Pro – пролин, Thr – треонин, Ala – аланин
 C – цитозин, T – тимин, G – гуанин, A – аденин

Замена аденина на гуанин в позиции 15218, приводящая к миссенс-мутации p.Thr158Ala, обнаружена с низкой частотой как у пациентов с мужским бесплодием (3% у пациентов с нормоспермией и 3,3% у мужчин с патоспермией), так и в группе сравнения (2,6%). Статистический анализ не выявил значимых различий в частоте мутаций между группами пациентов и здоровых индивидов (P>0,05).

Анализ распределения частот генотипов полиморфного локуса rs527236194 гена митохондриального цитохрома B выявил статистически значимую разницу

между бесплодными пациентами с патоспермией и группой фертильных индивидов ($p=0,04$). Полиморфизм rs527236194 гена митохондриального цитохрома В обуславливает замену триплета [CCT] на [CCC] в позиции 15784 и приводит к синонимичной замене пролина в позиции 346 белка. Несмотря на то, что этот полиморфизм не модифицирует структуру белка, он может играть регуляторную роль и, по мнению отдельных авторов, смещение кодонов может быть механизмом, контролирующим уровень экспрессии генов [30].

Таким образом, при анализе трех полиморфных вариантов гена митохондриального цитохрома В сперматозоидов обнаружена ассоциация полиморфного варианта rs527236194 с развитием бесплодия. Подтверждение полученных данных на больших выборках позволит в дальнейшем решить вопрос о целесообразности использования указанного локуса в качестве маркера риска возникновения мужского бесплодия.

4.2. Роль ассоциации полиморфных локусов rs25487 и rs415407 гена белка XRCC1 в развитии мужского бесплодия

Проблемы сперматогенеза, развития яичек, созревания и миграции сперматозоидов могут быть связаны с нарушениями процессов репарации ДНК. Аномалии механизма репарации могут обуславливать повреждение ДНК в зародышевых клетках, что приведет к дефектам сперматогенеза и бесплодию. Прецизионная репарация ДНК необходима для поддержания целостности и качества генома зародышевых клеток. Следовательно, система устранения повреждений ДНК является ключевым элементом поддержания оплодотворяющей способности эякулята.

Одним из центральных факторов репарации ДНК является многодоменный белок XRCC1. Этот белок, совместно с комплексом ферментов, включая НАД-зависимую полиАДФ-рибозополимеразу (polyADP-ribosepolymerase – PARP),

участвует в устранении основных типов повреждения ДНК – одно- и двухцепочечных разрывов полинуклеотидной цепи [132].

Ранее показано, что однонуклеотидные полиморфизмы *XRCC1* могут коррелировать с предрасположенностью к мужскому бесплодию, однако результаты различных исследований остаются противоречивыми. Этот фрагмент работы выполнен с целью поиска возможной связи риска бесплодия у мужчин с различными вариантами спермограммы и описанными в литературе перекрестными полиморфизмами гена *XRCC1*. Кроме того, представляла интерес оценка взаимоотношений системы репарации ДНК сперматозоидов и окислительно-восстановительного статуса эякулята, которые функционально сопряжены через PARP и коферменты НАД⁺/НАДН с гексокиназой, сиртуинами, апоптозом и активностью митохондрий [133].

Результаты генотипирования полиморфных вариантов rs25487 и rs415407 гена *XRCC1* у пациентов с нормо- и патоспермией и в группе фертильных мужчин, а также анализ ассоциации данных полиморфных локусов с риском развития мужского бесплодия представлены в таблице 4.2.

Видно, что у пациентов с патоспермией с наибольшей частотой обнаружен генотип rs25487*AG полиморфного локуса rs25487 (54,8%). У пациентов с нормоспермией этот генотип встречался незначительно реже (52,5%), как и у фертильной группы (53,8%), различия были статистически незначимыми ($p > 0,05$). Генотип rs25487*AA встречался статистически значимо чаще у пациентов с нормоспермией по сравнению с патоспермией. Так, его частота при нормоспермии составила 33%, при патоспермии – 17,6%, различия были статистически значимыми ($p = 0,03$). Следовательно, генотип rs25487*AA является маркером пониженного риска развития бесплодия у мужчин (OR=0,3, 95% CI=0,12-0,87). Генотип rs25487*GG, напротив, статистически значимо чаще встречался у пациентов с патоспермией (28,7%) по сравнению с индивидами с нормоспермией (13,75%) и фертильной группой (12%). Различия также были статистически значимыми ($p = 0,03$). Таким образом, генотип rs25487*GG следует

считать маркером повышенного риска развития мужского бесплодия (OR=2,8, 95%CI=1,13-7,00).

Таблица 4.2 - Распределение частот генотипов полиморфных локусов rs25487 и rs415407 гена *XRCC1* у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

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

Распределение частот аллелей также статистически значимо различалось у пациентов с патоспермией и нормоспермией. Частота аллеля rs25487*A составляла 42% и 58% у пациентов с патоспермией и нормоспермией, соответственно, а частота аллеля rs25487*G – 60% и 40%, соответственно. Следовательно, аллель rs25487*A является генетическим маркером пониженного риска развития бесплодия (p=0,007, OR=0,48, 95%CI=0,28-0,82), а аллеля rs25487*G – маркером повышенного риска мужского бесплодия (p=0,007, OR=2,1, 95%CI=1,23-3,59).

При генотипировании полиморфного локуса rs415407 гена *XRCC1* выявлено, что у бесплодных пациентов с патоспермией наиболее часто встречался

генотип rs415407*AC полиморфного локуса rs415407 (52,4%). Вместе с тем, этот генотип встречался с близкой частотой как у пациентов с нормоспермией (49,8%), так и у фертильных мужчин (47,3%). Различия в частотах распределения указанного генотипа статистически незначимы. Генотип rs415407*AA полиморфного локуса rs415407 выявлялся у мужчин с нормоспермией в 27,3%, у пациентов с патоспермией – в 26,2% ($P>0,05$). У фертильных мужчин генотип rs415407*CC обнаружен в 25,2%, у индивидов с нормоспермией – в 22,2%, а у пациентов с патоспермией в 21,4%. Различия результатов были статистически незначительными ($p>0,05$).

Таким образом, результаты этого фрагмента работы свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфных локусов rs25487 в гене XRCC1 с риском развития идиопатического мужского бесплодия. Напротив, генотип rs25487*AA и аллель rs25487*A гена XRCC1 обладают протективным эффектом относительно риска развития патологии спермограммы.

Продемонстрировано также наличие прямой связи полиморфизма XRCC1 Arg399Gln с показателями подвижности и особенностями структуры сперматозоидов. Связи генотипа rs25487*GG и аллеля G носили обратный характер. Вместе с тем, количество сперматозоидов в эякуляте при генотипе AA было незначительно ниже, чем у субъектов с генотипами GG и GA ($p<0,05$).

Выявлено также, что изменения частоты генотипа AA у пациентов с патоспермией относительно нормоспермии сопряжены с колебаниями редокс-потенциала и уровня окисленной формы никотинамидных коферментов. При анализе этого генотипа полиморфного локуса rs415407 гена XRCC1 установлены статистически значимые положительные связи с концентрацией НАД⁺ и соотношением НАД⁺/НАДН, но отрицательные с показателем фрагментации ДНК сперматозоидов в эякуляте.

Теоретически любое изменение гена XRCC1, из-за полиморфизма Arg399Gln с заменой остатка аргинина на глутамин, может нарушить функцию воспроизводства и увеличивает риск мужского бесплодия. Так, по данным Zheng

[32], генотип AA имеет тесную связь с повышенным риском идиопатической азооспермии у ханьцев Северного Китая. По другим сведениям, генотипы AA и GG в иных популяциях связаны со снижением риска мужского бесплодия, хотя, по данным последнего метаанализа значимой связи между полиморфизмом *XRCC1* Arg399Gln и мужским бесплодием в общей выборке не было [134]. Авторами делается вывод о существенных этнических особенностях зависимости частоты мужского бесплодия от характера SNP этого гена, что затрудняет интерпретацию большого массива имеющихся данных.

ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ МУЖСКОМ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЕГО РАЦИОНАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИИ

В этом разделе работы приведены сведения об особенностях динамики свободнорадикальных процессов в эякуляте при идиопатической инфертильности пациентов с различными вариантами спермограммы. Акцент поставлен на изучение роли дисфункции митохондрий в инициации оксидативного повреждения сперматозоидов.

Известно, что дисбаланс между активаторами генерации АФК и антиоксидантной способностью различных отделов мужского репродуктивного тракта, независимо от природы этиологических факторов, рассматривается как ключевой признак инициации окислительного стресса [6, 135]. Авторы «Руководства ВОЗ по обработке и исследованию эякулята» (WHO, 2021) [136], подчеркивая значимость тестирования уровня оксидативного стресса, посвятили этому вопросу специальный раздел.

5.1. Соотношение про- и антиоксидантных систем эякулята при идиопатическом мужском бесплодии

Для оценки скорости генерации активных форм кислорода был использован способ измерения сверхслабого свечения, возникающего при образовании свободных радикалов в биологических средах, с добавлением в среду инкубации люминола для усиления хемилюминесценции [136].

Пример записи люминолзависимой хемилюминесценции эякулята представлен на рисунке 5.1. В качестве критерия интенсивности свечения была принята светосумма за 5 минут измерения. При расшифровке параметров хемилюминесценции у пациентов с идиопатическим бесплодием было

зафиксировано увеличение светосуммы с отклонением от нормативных показателей, что соответствует результатам определения других параметров окислительного статуса эякулята в тех же образцах (таблица 5.1).

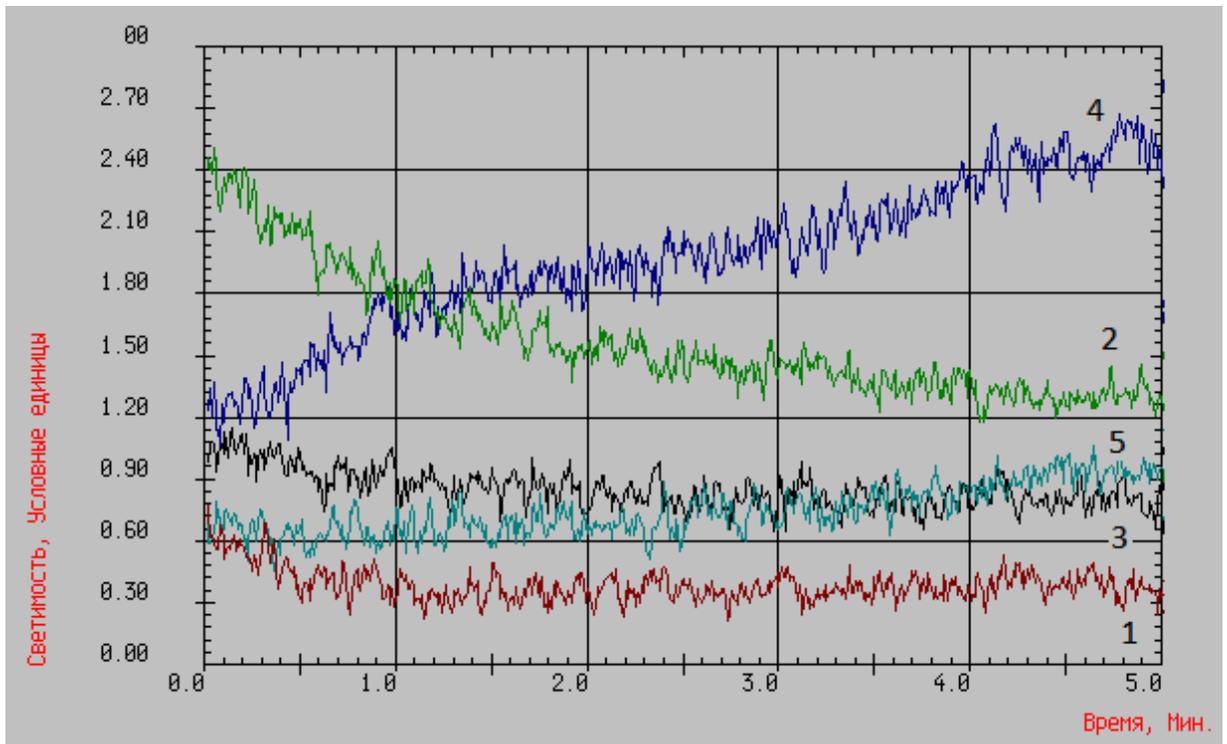


Рисунок 5.1 – Динамика ЛЗХЛ эякулята у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием; 1, 3 – показатели фертильных мужчин; 2, 4 – показатели бесплодных мужчин; 5 – контроль.

Таблица 5.1 - Показатели ЛЗХЛ эякулята здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (отн. ед.)

Показатели ЛЗХЛ	Светосумма	Спонтанная светимость	Максимальная светимость
Фертильные доноры	4,4±0,68	1,1±0,34	1,8±0,23
Бесплодные (нормоспермия)	8,7±1,25*	1,8±0,27	2,7±0,34*
Бесплодные (патоспермия)	8,2±1,30*	1,7±0,22	2,5±0,29*

*различия статистически значимы по сравнению с фертильными донорами при $p < 0,05$

Результаты, представленные в таблице 5.1, указывают на статистически достоверные различия между светосуммой фертильных доноров и бесплодных мужчин. Этот параметр является наиболее значимым в оценке ЛЗХЛ и отражает фактически двукратное увеличение у таких пациентов генерации свободных радикалов. Эти данные свидетельствуют об активации процессов свободнорадикального окисления в эякуляте у бесплодных мужчин независимо от вариантов изменений спермограммы.

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

Параметры редокс-статуса семенной жидкости обследованных пациентов приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 - Показатели состояния липопероксидного процесса в эякуляте здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии (M±m)

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

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

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

Как видно из таблицы 5.2, у бесплодных (при нормоспермии и патоспермии) пациентов уровень LРх - первичных продуктов окисления липидов, был статистически значимо выше, чем у фертильных доноров ($p < 0,05$). Гидропероксиды липидов быстро превращаются в различные вторичные дериваты окислительных процессов: малоновый диальдегид, акролеин, 4-гидроксиноненаль (4-HNE) и др.

4-HNE играет двоякую роль: в низких концентрациях он выступает в качестве защитной сигнальной молекулы при экспрессии генов, а при избытке – как цитотоксический промотор патогенных процессов [137]. Он представляет собой α, β -ненасыщенный альдегид, образующийся из арахидоновой или линолевой кислот путем их трансформации свободными радикалами. Благодаря высокой реакционной способности, этот альдегид алкилирует белки, повреждает ДНК клеток и, в конечном итоге, вызывает их гибель.

Синтез 4-HNE в различных клетках, в том числе в гаметях, катализируется арахидонат-15-липоксигеназой (ALOX15). Следовательно, селективное ингибирование этого фермента может быть действенным способом снижения интенсивности перекисного окисления липидов в зародышевых клетках [138; 139].

Биохимическая активность 4-HNE определяется электрофильным характером его молекулы и наличием трех функциональных элементов: двойной связи, гидроксильной и карбонильной групп. С учетом этого, обнаруженный нами факт почти двукратного увеличения степени карбонилирования белков эякулята у бесплодных мужчин является не случайной находкой (см. таблица 5.2). Одной из основных мишеней карбонилирования являются специализированные белки сперматозоидов, участвующие в капацитации, что влечет за собой значительное снижение способности гамет к проникновению в яйцеклетки [140].

По другим данным, карбонилированные белки локализуются преимущественно в митохондриях сперматозоидов или в их ближайшем окружении, что сопровождается митохондриальной дисфункцией, нарушениями

реакций фосфорилирования/дефосфорилирования и повреждением двигательного аппарата гамет [141].

К специфическим продуктам липопероксидации относятся и т.н. ТБК-реагирующие продукты – группа соединений, вступающих во взаимодействие с тиобарбитуровой кислотой, основным представителем которой является малоновый диальдегид (МДА, MDA). По нашим данным, уровень ТБК-РП в эякуляте пациентов обеих групп с бесплодием существенно превышал показатели фертильных доноров ($p < 0,05$) без сколь-либо существенной разницы между ними.

Эти молекулы также карбонируют различные клеточные структуры, но имеют тропность к разным сайтам связывания: 4-HNE взаимодействует преимущественно с гистидином или цистеином, MDA чаще с областью пептида, обогащенной лизином [142]. Очевидно, что именно с этим могут быть связаны неидентичные эффекты 4-гидроксиноненаля и малонового диальдегида в живых системах. Если первый обладает широким спектром негативных эффектов и взаимодействует с любыми макромолекулами, то второй избирательно связывается с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот и имеет мутагенные, в том числе – канцерогенные, свойства. Кроме того, MDA, посредством посттранскрипционной модификации РНК, изменяет информацию при различных формах патологии, включая мужское бесплодие [143].

Важным показателем состояния системы липопероксидации эякулята (помимо прооксидантных факторов и субстратов окисления) является наличие и эффективность его антиоксидантных факторов. Это оценивается по показателю общей антиокислительной активности объекта исследования – ОАА (Total antioxidant capacity – TAC). Данные об ОАА дают возможность оценить кумулятивную способность клеток/тканей к нейтрализации АФК и поддержанию баланса эффектов про- и антиоксидантных систем. По кинетике процесса ингибирования окисления ABTS и удаления его катион-радикала измеряется суммарная ёмкость обоих звеньев антиоксидантной защиты семенной плазмы – ферментативного и неферментативного.

Нами выявлено существенное снижение антиоксидантных резервов эякулята у пациентов обеих групп: при нормоспермии этот показатель был равен 77% ($p < 0,05$) от значения в группе сравнения, а при патоспермии 44% ($p < 0,05$). Это вполне закономерно, поскольку избыточная генерация свободных радикалов и повышенная интенсивность процессов липопероксидации приводит к истощению факторов антиоксидантной системы биологических объектов.

Важно, что уровни гидропероксидов липидов, ТБК-реагирующих продуктов и карбонилированных белков в семенной жидкости отрицательно коррелировали с параметрами спермы: наиболее выраженные ассоциации содержания всех трех названных аналитов имелись с показателями прогрессивной подвижности и количеством аномальных сперматозоидов ($p < 0,01$). При этом гидропероксиды липидов и дефектные гаметы демонстрировали статистически значимую экспоненциальную положительную зависимость в обеих группах бесплодных пациентов, тогда как значения карбонилированных белков были достоверно связаны с этим показателем спермограммы лишь при патоспермии.

Таким образом, нами выявлены признаки интенсификации окислительного стресса в эякуляте при мужском бесплодии. Это проявилось избыточной генерацией АФК и липопероксидацией на фоне снижения эффективности факторов антиоксидантной защиты эякулята. Вместе с тем, развитие этого феномена при мужском бесплодии не признается отдельными авторами [144], что является основанием для продолжения поиска в этом направлении для уточнения его причин и механизмов.

5.2. Роль фрагментации ДНК сперматозоидов в развитии мужского бесплодия

Одним из важнейших нововведений шестой версии «Руководства ВОЗ по обработке и исследованию эякулята [136] является рекомендация по необходимости проведения оценки целостности генетического материала

сперматозоидов, для чего предлагается использование теста фрагментации ДНК, включенного в перечень расширенных (extended) методов исследования при мужском бесплодии.

В качестве основной причины возникновения одно- и двунитевых разрывов ДНК сперматозоидов называется чрезмерная активация окислительного стресса, продукты которого имеют выраженное сродство к нуклеотидам (см. раздел 5.1). Хотя способность к оплодотворению дефектными сперматозоидами может и не нарушаться, многочисленные мета-анализы, опубликованные в последние годы, показывают, что повреждение ДНК негативно влияет на развитие эмбриона, имплантацию и беременность как в естественном цикле, так и при ВРТ [145].

Степень фрагментации ДНК сперматозоидов у 60 обследованных нами мужчин без нарушения репродуктивной функции изменялась в диапазоне от 1 до 24% (таблица 5.3). Средний уровень равнялся 4,9%. Согласно мнению экспертов, доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК у фертильного мужчины не должна превышать 15% [146, 147]. Тем не менее, у 7 фертильных мужчин, имеющих здоровых детей, эта величина составляла от 16 до 28%.

У инфертильных мужчин с нормозооспермией этот показатель варьировал от 4 до 80% (в среднем 10,9%), а у пациентов с патозооспермией – от 3 до 82% (в среднем 12,1%), т.е. существенных отличий обнаружено не было.

Таблица 5.3 - Показатель фрагментации ДНК сперматозоидов у здоровых мужчин и пациентов с бесплодием при нормо- и патоспермии

Параметр	Здоровые мужчины	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия	Патоспермия
ДНК-фрагментация сперматозоидов, %	1-24	4-80	3-82
Среднее значение	4,9	10,9	12,1

Если низкий уровень повреждений ДНК у фертильных доноров и высокий у пациентов с патоспермией представляется закономерным и широко освещен в литературе, то факт выраженной деструкции ДНК у пациентов с нормоспермией нуждается в детальном рассмотрении.

Для дальнейшего анализа мужчины этой группы были разделены на три подгруппы в соответствии с условной нормой фрагментации ДНК, рекомендованной по данным метаанализа [146] – менее 15%. В первую вошли пациенты с уровнем фрагментации ДНК в пределах нормы, т.е. до 15% (n=12); вторую – мужчины, у которых степень фрагментации ДНК сперматозоидов колебалась в диапазоне от 15,1 до 30% (n=14); третью подгруппу составили мужчины, у которых фрагментация ДНК сперматозоидов превышала 30% (n=34). Далее в каждой подгруппе был выполнен корреляционный анализ между основными параметрами стандартной спермограммы и показателями свободнорадикального гомеостаза эякулята.

Наибольшее количество взаимосвязей обнаружено у пациентов третьей подгруппы с высоким уровнем фрагментации ДНК. Так, содержание карбонильных дериватов было пропорционально доле морфологически аномальных сперматозоидов ($r=0,44$, $p<0,05$). В отличие от этого, в первых двух группах такая связь отсутствовала, что может объясняться как высокой вариабельностью параметров процесса липопероксидации, так и меньшей степенью дисбаланса про- и антиоксидантных факторов у этой категории мужчин.

Что касается значения общей антиокислительной активности эякулята, то его величина статистически значимо коррелировала с показателями фрагментации ДНК мужчин также третьей подгруппы. Нами обнаружена сильная однонаправленная прямая связь изменений ОАА с прогрессивной подвижностью сперматозоидов ($r=0,39$, $p<0,05$), что подчеркивает тесную зависимость структуры ДНК сперматозоидов от эффективности антиоксидантных факторов спермоплазмы.

Также обнаружена связь между величиной редокс-потенциала, как меры окислительного стресса, и степенью фрагментации ДНК сперматозоидов. В обеих группах бесплодных мужчин выявлена прямая корреляция этих показателей: у пациентов с нормоспермией коэффициент корреляции был равен 0,31; $p < 0,01$; у пациентов с патоспермией 0,29; $p < 0,02$.

В целом, полученные в настоящем фрагменте работы факты позволяют утверждать, что окислительный стресс и повреждение ДНК сперматозоидов выступают в качестве двух тесно сопряженных патогенных факторов развития мужского бесплодия.

5.3. Влияние биологически активных добавок на течение свободнорадикальных процессов в модельных системах

В настоящее время существует множество эффективных методов лечения бесплодия у женщин. В отличие от этого, при мужском бесплодии возможности успешного лечения ограничены. Исходя из существенной роли окислительного стресса в развитии мужского бесплодия, для улучшения качества спермы проводится лечение пациентов различными препаратами с антиоксидантным действием [3, 148]. Медикаментозная терапия идиопатического мужского бесплодия исторически была эмпирической и основывалась в основном на данных небольших обсервационных исследований, а не крупных хорошо спланированных клинических испытаний.

Именно поэтому особый интерес представляют результаты международного исследования «Мужчины, антиоксиданты и бесплодие» (MOXI) [149]. Это одно из немногих крупных многоцентровых рандомизированных клинических исследований, в котором не было продемонстрировано улучшения параметров спермы или показателей живорождения при использовании антиоксидантов. Одной из причин такой неоднозначной ситуации является применение неадекватных дозировок препаратов с развитием осложнений по типу редуцированного стресса [150]. В настоящее время для коррекции окислительного

статуса сперматозоидов предложен широкий спектр биологически активных соединений, действующих на различные мишени и обладающих различной эффективностью.

В связи с этим на следующем этапе работы нами была предпринята попытка анализа данных о влиянии соединений с антиоксидантными свойствами на свободнорадикальные процессы *in vitro* в диапазоне концентраций, близких к их содержанию в семенной плазме мужчин [67].

В работе нами были использованы биологически активные добавки (БАД) «АндроДоз»® (Россия) и «Проксид Плюс» (Proxeed®plus, Италия), которые ранее применялись различными исследователями [13; 151] с целью нормализации параметров спермы при идиопатическом бесплодии.

Одна капсула БАД «АндроДоз»® содержит 180 мг L-аргинина, 60 мг L-карнитина, 23 мг L-карнозина, 2,5 мг коэнзима Q10, 1,5 мг глицирризиновой кислоты, 1,2 мг цинка, 0,8 мг витамина E, 0,09 мг витамина A, 8,5 мкг селена. Суточный прием – 4 капсулы, что соответствует 12-80% рекомендуемого уровня суточного потребления содержащихся в них веществ.

Одно саше БАД «Проксид Плюс» содержит 1000 мг L-карнитина, 500 мг ацетил-L-карнитина, 50 мкг селена, 20 мг коэнзима Q10, 1000 мг фруктозы, 50 мг лимонной кислоты, 10 мг цинка, 90 мг аскорбиновой кислоты, 200 мкг фолиевой кислоты, 1,5 мкг витамина B12. Суточный прием – два саше, что соответствует или несколько выше рекомендуемого уровня суточного потребления содержащихся в них веществ.

Важнейшим компонентом обеих комбинаций является L-карнитин. Оба состава включают также коэнзим Q10, селен, цинк, остальные ингредиенты отличаются. Важно, что содержание указанных соединений в пересчете на суточную дозу в «Проксид Плюс» намного больше, чем в «АндроДоз»®: по карнитину – в 12 раз, по коэнзиму Q10 и цинку – в 4 раза, по селену – в 3 раза.

БАД «АндроДоз»® растворяли в бидистиллированной воде до концентрации карнитина 0,65 мг/мл, то есть таким образом, чтобы его конечная

концентрация в среде инкубации соответствовала физиологическому уровню в спермоплазме. БАД «Проксид Плюс» разводили до концентрации карнитина в 2,8 раза большей, то есть соответствующей превышению его содержания в суточной дозе по сравнению с Андродозом и применяли в модельных системах, описанных в разделе 2.2.

На рисунке 5.2 приведены результаты эффектов указанных БАД в модельной системе №1 *in vitro*, генерирующей АФК. Представленные данные свидетельствуют о достаточно высокой антиоксидантной активности обоих препаратов. Добавление Андродоза и Проксид Плюс в инкубационную среду, содержащую сернокислое железо и люминол, в количестве, сопоставимом по содержанию карнитина с его физиологическим уровнем в семенной плазме, значительно угнетало интенсивность свечения в модельной системе. Степень подавления АФК у препаратов существенно отличалась: если Проксид Плюс практически полностью блокировал процессы радикалообразования кислорода, то Андродоз снижал интенсивность свечения на 60%.

Близкие результаты были получены при исследовании активности препаратов с помощью модельной системы №2, которая позволяет оценить их действие на интенсивность процессов перекисного окисления липидов. С этой целью Андродоз и Проксид Плюс добавляли к липидам куриного желтка, сходным по составу с липидами крови.

Из представленных записей хемилюминограмм следует, что показатели медленной вспышки заметно уменьшаются при добавлении в модельную систему Андродоз и Проксид Плюс (рисунок 5.3), т.е. антиокислительные свойства этих препаратов проявляются и в биологической среде.

В работе была также определена светосумма свечения (полный выход зарегистрированного излучения) как интегральный параметр интенсивности хемилюминесценции и другие показатели люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) при использовании препаратов Андродоз и Проксид Плюс, представленные в таблице 5.4.

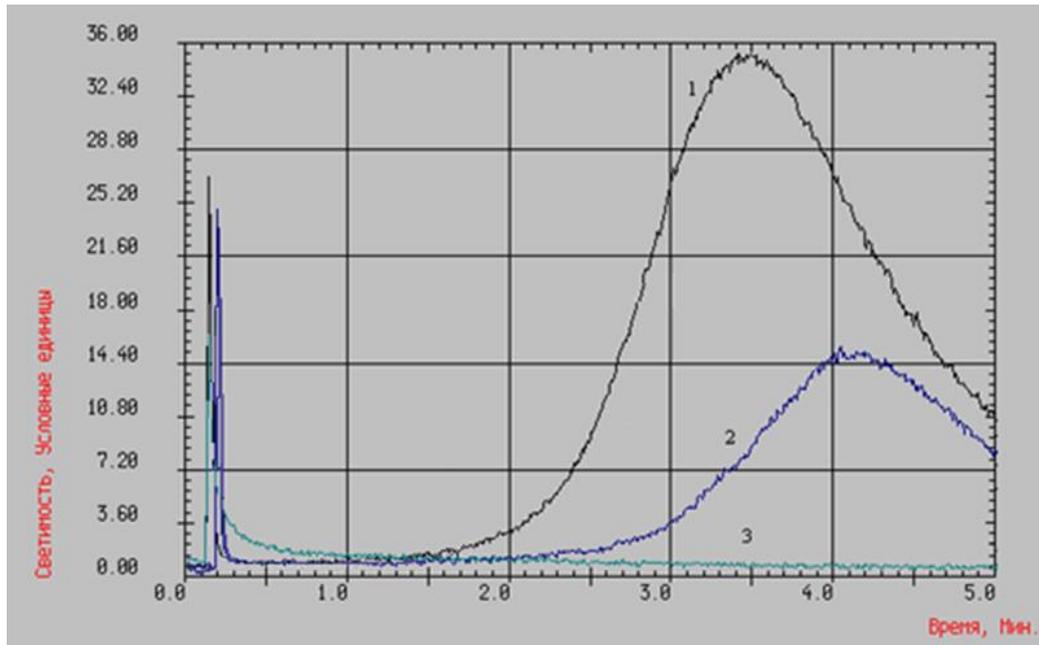


Рисунок 5.2 - Динамика ХЛ в модельной системе №1, генерирующей АФК, при добавлении антиоксидантных препаратов
1 – контроль; 2 – Андродоз; 3 – Проксид Плюс

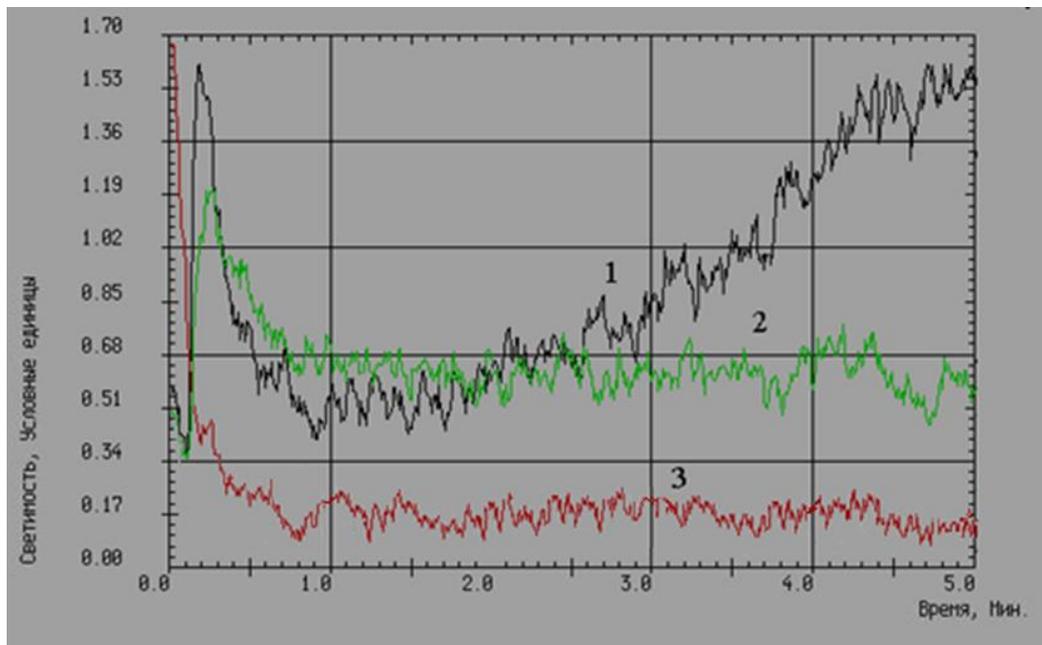


Рисунок 5.3 - Динамика ХЛ в системе, инициирующей реакции перекисного окисления липидов, при добавлении антиоксидантных препаратов
1 – контроль; 2 – Андродоз; 3 – Проксид Плюс

Таблица 5.4 - Уровни люминолзависимой хемилюминесценции в модельной системе №2 при добавлении препаратов с антиоксидантным действием Андродоз и Проксида Плюс (усл. ед.), n=20

Параметр	Контроль	Андродоз	p	Проксид Плюс	p
Светосумма	3,9±0,16	2,9±0,19	0,0003	2,4±0,18	0,0001
Спонтанная светимость	1,27±0,06	1,3±0,2	0,8865	0,7±0,14	0,0006
Максимальная светимость	1,67±0,06	1,1±0,14	0,0010	1,1±0,1	0,0001

Примечание: результаты представлены в виде $M \pm m$, где M - средняя арифметическая, m - стандартная ошибка средней арифметической, p - уровень статистической значимости

Анализ данных об изменении показателей общей антиокислительной активности в модельных системах под влиянием этих препаратов выявил статистически значимые различия между значениями светосуммы, которые при добавлении и Андродоза и Проксид Плюс уменьшались, соответственно, на 26 и 38 %. Существуют доказательства, что величина светосуммы ХЛ в модельной системе, имитирующей биосреды, отражает потенциальную способность клеточных липидов вступать в реакции перекисления [135]. Исходя из этого, правомерно мнение о защитном действии комплекса соединений, входящих в состав названных препаратов, в отношении биологических мембран, включая субклеточные структуры сперматозоидов [152, 153].

Пропорционально светосумме, при добавлении Андродоза и Проксид Плюс, снижался также индекс максимальной светимости, что косвенно свидетельствует об увеличении антиоксидантной ёмкости модельной биосистемы. На основании этих данных можно заключить, что использованные в настоящей работе биологически активные вещества при их применении *in vivo* способны модулировать свойства семенной жидкости благодаря повышению уровня суммарной антиоксидантной активности.

В настоящем исследовании *in vitro* подтвержден высокий антиоксидантный потенциал многокомпонентных комбинированных составов на основе карнитина, витаминов и микроэлементов в обеих использованных модельных системах. В эквивалентных по карнитину дозах установлено более выраженное ингибирующее влияние препарата Проксид Плюс, вплоть до полного подавления липопероксидации, что может индуцировать дефицит свободных радикалов, необходимых для оптимального обеспечения жизненно важных процессов в сперматозоидах. Умеренные эффекты Андродоза обусловлены, очевидно, меньшим содержанием биологически активных ингредиентов и более сбалансированным составом, что снижает риски развития осложнений в виде «антиоксидантного парадокса» или редуктивного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

По оценкам экспертов ВОЗ, около 90 миллионов супружеских пар во всем мире в настоящее время затрагивают проблемы с фертильностью [3]. Мужское бесплодие является одной из фундаментальных проблем репродуктивной медицины, решение которой на молекулярном уровне имеет существенное значение для предоставления нуждающимся парам шанса родить ребенка в естественном цикле или посредством вспомогательных репродуктивных технологий [154]. Исследования последних лет указывают на неуклонно прогрессирующее снижение как концентрации сперматозоидов, так и изменение параметров спермограммы даже у фертильных мужчин [155].

Помимо недостаточных до настоящего времени сведений об этиологии мужского бесплодия, научное и медицинское сообщество сталкивается с двойным бременем: поиском эффективных биомаркеров нарушения мужской фертильности и новых подходов, которые могут ее сохранить или повысить.

С целью прогнозирования репродуктивного потенциала и контроля качества лечения мужского бесплодия используется классический анализ спермограммы в соответствии с рекомендациями экспертов ВОЗ. Эти рекомендации включают определение стандартизированными методами рутинных параметров эякулята, нижние референтные пределы которых имеют малую чувствительность, что не позволяет получить достоверную информацию для оценки вероятности зачатия. При этом субфертильные мужчины нередко ошибочно классифицируются как «нормальные». В связи с этим, другие факторы, способствующие нестабильности генома и метаболическим нарушениям в сперматозоидах (детерминированным, во многом, митохондриальной патологией), могут быть не приняты специалистами во внимание [73; 156].

Несмотря на совершенствование диагностических процедур, включая генетические технологии, примерно 30-80% случаев мужского бесплодия являются идиопатическими, т.е. причины нарушений фертильности установить не

удается [1]. По нашим и литературным данным последних лет, в среднем около 20% мужчин с идиопатическим бесплодием составляют пациенты без признаков патогенных изменений в стандартной спермограмме, т.е. с нормоспермией [3, 5, 157]. Этот контингент мужчин, наиболее сложный с позиций диагностики, был выделен в настоящем исследовании в отдельную категорию.

Важнейшую роль в обеспечении мужской фертильности играет двигательная активность сперматозоидов. Движение к месту оплодотворения и нормальное взаимодействие с ооцитом обеспечивается макроэргическими соединениями, которые синтезируются главным образом в митохондриях сперматозоидов. Известно, что балансу процессов анаболизма и катаболизма в цикле трикарбоновых кислот, а также уровню АТФ относительно АДФ/АМФ принадлежит существенное значение в клеточном энергетическом гомеостазе [158, 159].

Митохондрии представляют собой многоцелевые органеллы, обеспечивающие клеточный гомеостаз [160]. Интегрируя сигнальные сети, митохондрии активируют адаптивный ответ на стресс и снабжают энергией, необходимой для оптимальной жизнедеятельности клеток и организма в целом. Репродуктивная функция – это весьма энергозатратный процесс, направленный на обеспечение безопасной передачи нуклеиновых кислот последующим поколениям.

Митохондрии – структурно и функционально уникальные органеллы мужских гамет [161]. Как единственные органеллы, оставшиеся в зрелых клетках, митохондрии не только продуцируют АТФ посредством окислительного фосфорилирования, но также занимают центральное положение в регуляции гомеостаза кальция, андрогенопоэза, апоптоза и межклеточных взаимодействий в процессе оплодотворения.

Имеются значительные пробелы в понимании роли митохондрий в генезе нарушений мужской фертильности. Расшифровка их механизмов может стать

ключом к разработке новых методов диагностики и целенаправленной терапии мужского идиопатического бесплодия.

В настоящее время ещё недостаточно исследованы механизмы взаимосвязи основных параметров спермограммы с изменениями молекулярных характеристик семенной плазмы и митохондриальной дисфункцией при идиопатическом бесплодии. Это относится к роли концентрации ионов кальция, цАМФ и АТФ, окислительно-восстановительного состояния пиридиннуклеотидов, активности ключевых ферментов митохондрий и уровня их субстратов, мутаций гена митохондриального цитохрома В и гена репарации ДНК XRCC1, степени фрагментации ДНК сперматозоидов и их ассоциаций с нарушением про- и антиоксидантных свойств эякулята в генезе идиопатического бесплодия у мужчин с различными вариантами базового анализа спермограммы [162-165].

Результаты наших исследований согласуются с данными большинства авторов о том, что одним из кардинальных метаболических признаков бесплодия неустановленной природы является дефицит АТФ, сопряженный с однонаправленными изменениями уровней ионов кальция и цАМФ как важных регуляторов окислительного фосфорилирования. Эти вещества действуют в качестве первичного и вторичного клеточных медиаторов образования восстановительных эквивалентов в форме НАДН, активности ферментных комплексов цикла трикарбоновых кислот, электротранспортной цепи и АТФ-синтазы [166; 167].

АТФ, цАМФ и ионы кальция, как инициаторы реакций фосфорилирования динеиновых комплексов в ходе созревания и обретения сперматозоидами двигательной активности, непосредственно контролируют скорость процессов апоптоза на разных стадиях их жизненного цикла [168-170]. Критический дефицит АТФ может сопровождаться некротическими проявлениями и развитием апоптоза гамет, аналогично влиянию недостатка АФК и их метаболитов.

Превращения АТФ тесно связаны с синтезом цАМФ, который непосредственно участвует практически во всех процессах, определяющих оплодотворяющие свойства сперматозоидов. В гаметях цАМФ потенцирует скорость гликолиза, является участником процессов транскрипции и трансляции, активатором их прогрессивной подвижности, модулятором транспорта катионов, индуктором окислительного фосфорилирования и АТФ-синтетазы в процессе капацитации и т.д. [171, 172].

Недостаточности этого мессенджера может принадлежать одно из центральных мест в генезе репродуктивных форм патологии, поскольку, наряду с упомянутыми свойствами, внеклеточный цАМФ активирует сигнальные пути, связанные с конденсацией/деконденсацией ДНК сперматозоидов и их межклеточными взаимодействиями [173].

Выявленные нами ассоциации между концентрацией макроэргов и вторичных посредников, с одной стороны, и оплодотворяющей способностью сперматозоидов, с другой, указывает на тесную взаимосвязь дисфункции митохондрий с нарушениями механизмов передачи сигналов, изменениями интенсивности апоптоза в герминативных клетках и дисбалансом редокс-систем эякулята. Основным элементом этих систем является двухкомпонентный комплекс никотинамидных коферментов НАД в окисленной и восстановленной формах.

Соотношение $[НАД^+]/[НАДН]$, которое рассматривается как системный регулятор метаболического статуса сперматозоидов, у здоровых доноров спермы существенно смещено в сторону окисленной формы кофермента. Это свидетельствует о преимущественно кислородзависимом типе энергетического обеспечения гамет. Выявленное нами снижение этой величины и накопление восстановительных эквивалентов в эякуляте при идиопатическом бесплодии означает утрату контроля клеточного гомеостаза со стороны пиридиннуклеотидов как одного из центральных регуляторных механизмов в норме и патологии [174].

Редокс-статус $[NAD^+]/[NADH]$ имеет ключевое значение для широкого спектра клеточных процессов в сперматозоидах, включая опосредованную гликогидролазами CD38 регуляцию внутриклеточного пула Ca^{2+} как самой древней и универсальной системы сигнализации клеток; репарацию ДНК при участии полиАДФ-рибозополимеразы; эпигенетический контроль экспрессии генов НАД-зависимыми деацетилазами; регуляцию пентозофосфатного пути окисления глюкозы и др. Неполный перечень последствий сдвигов уровня $[NAD^+]/[NADH]$ включает также изменение количества и состояния митохондрий, проводимости их ионных каналов, степени окислительной модификации и репарации ДНК, скорости ацетилирования гистонов и состояния других жизненно важных процессов [22, 24, 175, 176].

К молекулярным эффекторам этих процессов относятся, например, сиртуины, которые нуждаются в NAD^+ как в субстрате. В связи с этим, в условиях его убыли развивается недостаточность основных функций этих ферментов, в частности, нарушается цикл гистоны – протамины в процессе созревания гамет, степень конденсации хроматина, интенсивность белок-белковых взаимодействий, экспрессии генов и удаления поврежденных участков ДНК [177; 178]. Сиртуины как сенсоры окислительно-восстановительного статуса выполняют роль меж- и внутриклеточных трансммиттеров, связывая биоэнергетические и транскрипционные процессы, а также управляя реакциями апоптоза сперматозоидов. Именно поэтому обмен пиридиннуклеотидов и их предшественника никотинамида является предметом исследований, посвященных оптимизации поиска молекулярных мишеней различных форм патологии [179], не исключая и мужское бесплодие.

К существенным результатам этого раздела работы относится создание способа диагностики фертильности эякулята (патент на изобретение № 2789239 «Способ диагностики фертильности эякулята при идиопатическом бесплодии»). Способ заключается в колориметрическом определении концентрации окисленной формы кофермента NAD^+ в нативном эякуляте с помощью

стандартной реакции восстановления растворимого красителя (нитросиний тетразолий) с превращением в нерастворимый диформазаан. Показано, что концентрация NAD^+ в диапазоне от 91 до 120 нмоль/ 10^6 сперматозоидов соответствовала фертильному эякуляту.

Разработанный способ определения уровня НАД^+ может применяться для оценки мужской фертильности в клинической андрологии как дополнительный метод диагностики бесплодия. Этот метод позволяет еще до исследования спермограммы определить энергетический потенциал гамет и прогнозировать раннее «старение» сперматозоидов со снижением индекса фертилизации.

Система пиридиновых нуклеотидов тесно связана со специфическим изоферментом ЛДГ (С), с помощью которого обеспечивается стационарная скорость окисления глюкозы, физиологические концентрации лактата/пирувата и, в комплексе с другими белками, гомеостаз АТФ в сперматозоидах [180]. Нами показано, что при бесплодии в семенной плазме развивается дефицит пирувата на фоне избытка лактата. Снижение энергетической значимости пирувата в этих условиях может быть нивелировано за счет лактата благодаря его свойству к быстрому окислению, а также превращению в глюкозу с последующим окислением.

Лактатный механизм адаптации может играть существенную роль в физиологии и при расстройствах жизнедеятельности сперматогенных клеток. Лактат занимает особое место в энергообеспечении тканей мужского репродуктивного тракта: он не только стимулирует поглощение кислорода и быстрые линейные поступательные движения сперматозоидов, но также активирует биогенез митохондрий и выступает предпочтительным субстратом окисления [181].

Важно заметить, что в настоящее время наблюдается тенденция к переосмыслению роли и места лактата, а также пиридиновых нуклеотидов в клеточных процессах. Появляются сведения о новых функциях этих молекул, связанных с регуляцией свободнорадикальных процессов, координацией

биохимических реакций, межклеточной коммуникации и внеклеточного сигналинга [22]. Очевидно, что накопление лактата в спермоплазме с метаболических позиций является следствием гиперовосстановленности пиридиннуклеотидов и имеет, но не ограничивается только ею, адаптивную направленность.

Другому НАД-зависимому ферменту – изоцитратдегидрогеназе – отводится ведущая роль в контроле потока интермедиатов цикла трикарбоновых кислот, центральной части общего пути катаболизма и главного поставщика протонов и электронов в дыхательную цепь митохондрий. Нарушения в ЦТК тесно связаны с широким спектром форм патологии, включая нейродегенеративные процессы, слепоту, онкогенез, воспаление, ожирение и мужское бесплодие [169].

В настоящей работе обнаружено угнетение активности ИДГ, наиболее выраженное в группе пациентов с патоспермией, у которых величина этого показателя находилась в обратной зависимости с прогрессивной подвижностью сперматозоидов. Этот фермент является важнейшей контрольной точкой ЦТК и существует в трех изоформах: ИДГ1, ИДГ2 и ИДГ3. Первые два изоэнзима, локализованные в цитозоле и митохондриях соответственно, катализируют обратимое взаимопревращение изоцитрата и α -кетоглутарата с использованием НАДФ в качестве кофактора. Их как прямая реакция (окислительное декарбоксилирование), так и обратная (восстановительное карбоксилирование) играют решающую роль в липогенезе, контроле окислительно-восстановительного гомеостаза и пролиферации сперматозоидов.

ИДГ3 является ферментом цикла Кребса, использующим НАД^+ в качестве кофактора для катализа необратимого превращения изоцитрата в α -кетоглутарат и восстановления НАД^+ в НАДН в процессе митохондриального дыхания. ИДГ3 тонко регулирует скорость ЦТК посредством доступности субстрата и аллостерической регуляции. Активность фермента стимулируется цитратом, изоцитратом, НАД^+ , АДФ, ионами Mg, Mn^+ , Ca и ингибируется НАДН, α -кетоглутаратом, АТФ и НАДФН.

Не все эти взаимоотношения сохраняются при развитии различных форм патологии. Так, полная абляция ИДГ, как правило, сопровождается накоплением метаболитов «вышележащих» реакций ЦТК: цитрата, изоцитрата, аконитата, и неизменным уровнем сукцината, фумарата и малата [98]. В нашем исследовании выявлено умеренное, статистически значимое, снижение большинства этих соединений, что может указывать на интенсификацию их использования в альтернативных клеточных процессах: глюконеогенезе, липогенезе или синтезе заменимых аминокислот.

В целом изоцитратдегидрогеназная реакция прямо или опосредованно контролирует уровни практически всех метаболитов (цитрата, глюкозы, креатина, НАДН, АТФ и др.), необходимых для процессов биосинтеза, передачи клеточных сигналов и биоэнергетики сперматозоидов на всех этапах их клеточного цикла. Поэтому даже частичное подавление этой реакции сопровождалось значительными отклонениями метаболома эякулята, которые были выявлены в настоящем исследовании.

Это относится также к уровню и превращениям двух главных энергетических субстратов сперматозоидов – фруктозы и глюкозы, а также ключевых ферментов углеводного обмена – гексокиназы (ГК) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). Если содержание фруктозы и активность Г6ФДГ в эякуляте бесплодных мужчин практически не отличались от показателей здоровых доноров, то уровень глюкозы и активность ГК претерпевали статистически значимые изменения: концентрация глюкозы существенно уменьшалась на фоне стимуляции гексокиназной реакции. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении и даже усилении энергетической значимости глюкозы в условиях ограниченной доступности других субстратов, за исключением лактата.

Косвенным подтверждением этого допущения является описанный недавно феномен снижения прогрессивной подвижности сперматозоидов разобщителями процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Однако, при этом,

они не уменьшали содержания АТФ и не нарушали другие процессы. Это означает, что сперматозоиды обладают высокой метаболической пластичностью и могут переключаться на гликолиз для продукции АТФ при повреждении митохондрий [182].

Вместе с тем, имеются сведения о негативном влиянии гиперактивации окисления глюкозы в сперматозоидах, поскольку в ходе гликолиза в процессе превращений фосфотриоз (глицеральдегид-3-фосфата, дигидроксиацетонфосфата) и элиминации фосфатных остатков в качестве побочных продуктов образуются агрессивные соединения глиоксаль и метилглиоксаль, которые относятся к классу 2-оксоальдегидов [165]. Они являются сильными электрофилами, которые спонтанно реагируют с нуклеофильными участками белков, липидов и ДНК с образованием конечных продуктов гликирования, вызывая повреждения субклеточных структур сперматозоидов [183]. Метилглиоксаль может также образовывать аддукты с супероксиддисмутазой 1 (SOD-1), препятствуя ее антиоксидантному действию и потенцируя окислительный стресс [184].

Явление избыточной активации окисления углеводов с образованием гиперреактивных производных получило в литературе название «тёмная сторона гликолиза» (dark side of glycolysis) и было описано для ряда форм патологии, включая сахарный диабет, старение и болезнь Альцгеймера [185]. Возможно, при идиопатическом бесплодии складываются условия для подобного сценария и в сперматозоидах. Альтернативная потенциальная возможность компенсации энергодефицита в них возможна через креатинкиназный или пентозофосфатный шунты [186, 187], однако, судя по относительной интактности Г6ФДГ и умеренной стимуляции КФК, этот механизм реализуется лишь частично и не способен полностью возместить митохондриальную недостаточность.

К важнейшим митохондриальным свойствам, тесно связанным с качеством спермы, наряду с редокс-потенциалом, относят также полиморфизмы генов компонентов электронтранспортной цепи, НАД-ассоциированных ферментов

репарации ДНК, уровень транскриптов антиоксидантных энзимов и транслоказ ацил-L-карнитинов [74; 162].

Особенностью ДНК митохондрий является полуавтономность и отсутствие рекомбинаций. Для нее характерна также быстрая репликация без эффективной коррекции и репарации. Из-за особого механизма репликации и локализации в гиперокисленной среде частота мутаций мтДНК в 10-20 раз выше, чем у ядерной ДНК [74]. В целом, мтДНК сперматозоидов примерно в 100 раз более подвержена мутациям, чем ядерная ДНК. Такие мутации могут вызывать различные сдвиги: от незначительно проявляющихся до угрожающих жизни нарушений функций митохондрий [42].

Молекулы мтДНК сперматозоидов человека особенно чувствительны к окислительному стрессу и склонны к мутациям, которые, как было показано и другими авторами, играют важную роль в возникновении мужского бесплодия [47]. Одним из основных свойств мтДНК сперматозоидов является способность инициации синтеза АТФ в ходе окислительного фосфорилирования посредством кодирования белковых субъединиц дыхательной цепи. Этот процесс причастен также к генерации АФК и индуцированным ими повреждениям ДНК. Аномалии митохондриальной ДНК, в свою очередь, также увеличивают вероятность образования свободных радикалов, которые нарушают дифференцировку и функции сперматозоидов. Кроме того, подвижность сперматозоидов сильно зависит от уровня АТФ. Следовательно, вариации мтДНК сперматозоидов приводят и к синтезу дефектных белков [163].

Ранее было идентифицировано и генотипировано в общей сложности несколько десятков однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) комплексов III и V дыхательной цепи митохондрий: 13 SNP цитохрома В (MT-CYB), 14 SNP субъединицы 6 F₀-АТФ-синтазы (MT-АТР6) и 10 SNP субъединицы 8 F₀-АТФ-синтазы (MT-АТР8) [30, 188]. Поскольку наибольшее количество ассоциаций с мужским бесплодием было обнаружено для SNP цитохрома В, мы использовали

этот тест для оценки возможности его применения с целью выявления и дифференциации форм идиопатического бесплодия с нормо- и патоспермией.

В настоящем исследовании нами выполнен анализ трех полиморфных вариантов в гене митохондриального цитохрома В и выявлена ассоциация варианта rs527236194 с риском развития мужского бесплодия. Talebi с соавт. [31] идентифицировали несколько сложных перестроек, таких как делеции, в мтДНК дефектных сперматозоидов. Эти данные позволили установить связь между распространенной делецией в 4977 пар нуклеотидов (п.н.) и патоспермией. Стратифицированный анализ по фенотипу бесплодия показал тесную связь между этой аномалией и повышенным риском развития астенозооспермии, олигоастенотератозооспермии и астенотератозооспермии. Другие авторы указывают на то, что некоторые замены, например, С3398Т мтДНК, напротив, ассоциированы с низким риском развития астенозооспермии [189].

В более ранних исследованиях было показано, что мутация мтДНК А3243G и крупномасштабные делеции мтДНК связаны с астенозооспермией [190]. Кроме того, у субфертильных мужчин различные мутации мтДНК могут происходить в течение жизни. Такие мутации достигают высоких частот в отдельных клетках-предшественниках сперматозоидов, что приводит к нарушению их подвижности и бесплодию.

Mughal с соавт., проанализировав фрагмент гена длиной 8,7 тыс. п.н. с помощью ПЦР, выявили в нем множество делеций [191], частота которых была намного выше у пациентов с бесплодием, чем у фертильных мужчин. При сравнении различных подтипов бесплодия обнаружено, что наибольшая частота делеций мтДНК наблюдалась при олигоастенотератозооспермии. Статистический анализ данных группы случаев идиопатического мужского бесплодия показал значительную связь делеции 8,7 тыс. п.н. с бесплодием, наиболее выраженную при олигоастенотератозооспермии. Две другие делеции мтДНК – 4977 и 7599 п.н. также ассоциированы с патоспермией и могут быть генетическими факторами риска мужского бесплодия [31].

Таким образом, к митохондриальным маркерам мужского бесплодия отнесены три типа генетических нарушений: 1) увеличение количества копий мтДНК сперматозоидов; 2) протяженные делеции мтДНК (в несколько тысяч п.н.); 3) наличие синонимичных и несинонимичных mtSNP по типу обнаруженного нами варианта rs527236194 при астенотератозооспермии. Первые два типа аномалий мтДНК сравнительно хорошо изучены и характеризуются тесной связью со снижением оплодотворяющей способности гамет и малой вероятностью успешной беременности у пар в общей популяции [192; 193]. Вместе с тем, в последнее время опубликованы работы с альтернативной точкой зрения, т.е. единого мнения по этому вопросу пока достичь не удалось [194].

Сложная этиология и патогенез мужского идиопатического бесплодия и противоречивые результаты научных изысканий по этой проблеме требуют более масштабных проспективных исследований для подтверждения реально значимой роли мутаций мтДНК в развитии этой формы патологии. Учитывая, что частоты генотипов/аллелей полиморфных вариантов и мутаций генов существенно отличаются в различных этнических группах, необходимы дополнительные поиски доказательств ассоциации полиморфного варианта rs527236194 с риском развития мужского бесплодия с учетом этнического фактора [195].

Подтверждение полученных данных на больших выборках пациентов позволит решить вопрос о целесообразности выявления указанного локуса в качестве биомаркера риска развития этой формы патологии [196]. Перспективным направлением применения массива омиксных данных является также их использование для коррекции нарушений гаметогенеза и процесса оплодотворения, ассоциированных с мтДНК, благодаря быстрому развитию технологий редактирования митохондриального генома [197, 198].

Нами также была изучена связь полиморфных вариантов rs25487 и rs415407 гена *XRCC1* с риском развития мужского бесплодия. Среди различных систем репарации ДНК эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) являются двумя ключевыми механизмами, которые

восстанавливают небольшие локализованные и объемные повреждения ДНК, соответственно. Оба эти пути необходимы для восстановления ДНК в тестикулярных клетках [199]. Изменения способности ДНК к репарации обусловлены генетически и полиморфизмом ДНК. Это может привести к тонким структурным изменениям в белках репарации ДНК, что приводит к модуляции продукции сперматозоидов. Белок XRCC1 – один из центральных участников эксцизионной репарации оснований ДНК, который действует как «каркас» в привлечении различных компонентов к месту повреждения ДНК, повышая эффективность пути BER.

В нашей работе обнаружено, что генотип rs25487*GG и аллель rs25487*G являются маркерами повышенного риска развития идиопатического мужского бесплодия, а генотип rs25487*AA и аллель rs25487*A, напротив, ассоциированы с пониженным риском снижения фертильности у жителей Республики Башкортостан.

Ранее роль полиморфных вариантов гена *XRCC1* была изучена как в европейских, так и в азиатских популяциях пациентов с мужским бесплодием. Так, в результате четырех исследований, проведенных в европейских популяциях и двух в азиатских (1317 пациентов с мужским бесплодием и 1115 фертильных доноров) было выявлено, что полиморфизм Arg399Gln гена *XRCC1* ассоциирован с риском развития мужского бесплодия в обеих популяциях [32, 200]. Тесная связь наблюдалась в рецессивной модели (генотип GG сравнивали с генотипами GA+AA) и было подтверждено, что генотип GG ассоциирован со сниженным риском развития мужского бесплодия. Liu Z. [134] проведен метаанализ ассоциации полиморфных вариантов гена *XRCC1* с риском развития мужского бесплодия. В этой работе не было выявлено какой-либо взаимосвязи между генотипами/аллелями полиморфного варианта Arg399Gln гена *XRCC1* и риском развития мужского бесплодия, в том числе при сравнении гомозигот (GG vs AA), аллелей (G vs A), анализе гетерозиготной модели (GA vs AA) и доминантной модели (GA+GG против AA).

Изучалась также роль полиморфных вариантов гена *XRCC1* Arg194Trp и Arg399Gln у пациентов юго-восточного региона Турции с идиопатической необструктивной азооспермией [201]. Достоверных различий между контрольной группой и мужчинами с бесплодием по частотам распределения генотипов и аллелей этих полиморфных локусов обнаружено не было. В целом, видно, что данные различных авторов довольно противоречивы.

Исследование полиморфных вариантов гена *XRCC1* Arg399Gln и Arg280His как молекулярных маркеров патологии сперматогенеза было выполнено также у российских мужчин репродуктивного возраста в Ростовской области [202]. Для полиморфизма Arg280His гена *XRCC1* по распределению частот аллелей и генотипов обнаружены статистически значимые различия между группами с нормозооспермией и различными типами патоспермии. Расчет отношения шансов показал, что у группы пациентов с олигозооспермией мутантный аллель встречается в 5 раз чаще, чем у мужчин с нормозооспермией, гомозиготы по мутантному аллелю встречаются в 4,8 раза чаще, а гетерозиготное носительство мутантного аллеля – в 4,3 раза чаще при олигоспермии по сравнению с нормозооспермией. В объединенной группе с мужчин с патоспермией выявлено повышение встречаемости редкого аллеля *XRCC1* в 4,5 раза, а частота выявления гомозиготного редкого генотипа и гетерозиготного генотипа повышены, соответственно, в 3,9 и 3,5 раза. Для полиморфизма Arg399Gln исследуемого гена статистически значимых различий между анализируемыми группами не выявлено, что отличается от наших данных. Следовательно, имеется несовпадение результатов генотипирования даже в пределах одной популяции. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования на расширенных выборках пациентов с учетом этнических особенностей для выяснения роли генов репарации ДНК в патогенезе инфертильности.

Сложность проблемы заключается в том, что только с одним показателем сперматозоидов – их подвижностью, связано около семисот дифференциально экспрессируемых белков, из которых 512 показали значительно более низкий

уровень экспрессии, а 180 – более высокий у мужчин с олигоастенозооспермией по сравнению с нормозооспермией [203]. Теоретически любой из этих белков и их генов могут быть использованы в будущем для более точной оценки мужского фактора бесплодия.

Ещё один аспект рассматриваемой формы патологии, тесно ассоциированный с метаболическими и молекулярно-генетическими механизмами снижения оплодотворяющей способности, касается фрагментации ДНК сперматозоидов [164, 204]. Природа этого явления, описанного ещё в 90-х годах прошлого столетия, остается недостаточно изученной. Сохранность ДНК сперматозоидов имеет решающее значение для оплодотворения и развития здорового потомства. Как целостность хроматина, так и статус протаминирования определяют степень повреждения ДНК. Сперматозоид подвергается масштабному молекулярному ремоделированию ядра на поздних фазах сперматогенеза, что необходимо для конденсации ДНК и защиты генетической информации. Тестикулярные (дефектное созревание и abortивный апоптоз) и посттестикулярные (окислительный стресс) механизмы вовлечены в процесс фрагментации ДНК сперматозоидов, степень которой влияет как на естественное зачатие, так и на исходы процедур ВРТ [146, 205, 213].

Положение о сопряженности ДНК-фрагментации сперматозоидов с интенсификацией окислительных процессов и дисбалансом редокс-потенциала нашло подтверждение в нашем исследовании. Установлено, что у бесплодных мужчин доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК при нормоспермии составила 10,9%, а при патоспермии – 12,1%, достигая у отдельных индивидов очень высоких значений – до 82%, превышая показатели фертильных доноров в 2 и более раза.

При анализе взаимосвязей индекса фрагментации ДНК гамет бесплодных мужчин и параметров окислительного статуса семенной плазмы обнаружена прямая корреляция степени повреждения генетического материала от уровня карбонильных дериватов и величины редокс-потенциала, и обратная – от общей

антиокислительной активности. По данным доступных источников, ранее эта зависимость была продемонстрирована при различных вариантах патозооспермии – олиго-, астено-, тератозооспермии или их комбинации, но не при бесплодии с нормальными показателями эякулята. На основании этих результатов можно сделать допущение о том, что у большинства бесплодных мужчин с нормальной спермограммой снижение оплодотворяющей способности обусловлено повышенной фрагментацией ДНК в условиях нарушения равновесия между продукцией АФК и антиоксидантной защитой.

Активация репаративных процессов ДНК, которая инициируется её повреждением свободными радикалами, сопровождается гиперстимуляцией полиАДФ-рибозополимеразы (PARP) с потреблением большого количества НАД⁺ для восстановления нативной полинуклеотидной структуры. Этот хорошо известный в биологии клеточный феномен применительно к нашей проблеме может иметь два следствия. Во-первых, приводит к смещению клеточного редокс-потенциала и истощению по НАД⁺ с блоком переноса протонов и электронов по дыхательной цепи и энергетическому коллапсу сперматозоидов, во-вторых, сопровождается прямым ингибированием гексокиназы, которая имеет специфический сайт связывания с PARP, с тем же результатом [206]. Судя по обнаруженной нами стимуляции гексокиназы, в этой метаболической ситуации страдает митохондриальное звено катаболизма на уровне цитратного цикла или β -окисления.

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

Первое направление, применительно к предмету нашего исследования, является относительно новым и считается очень перспективным. Так, уже продемонстрировано защитное действие применения стимулятора метаболизма НАД никотинамидмононуклеотида на сперматогенную функцию у мышей с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином [207]. Подобный подход предлагается использовать не только при бесплодии, но также и для геропротекции, лечения сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [181].

Что касается второго направления, то, согласно результатам многочисленных исследований и их метаанализу, эффективность лечения мужского бесплодия антиоксидантами в различных вариантах остаётся низкой, особенно в части повышения показателей живорождения и частоты беременности. Это может быть обусловлено как эмпирическим характером терапии с последующим развитием дисбаланса редокс-систем эякулята, так и передозировкой отдельных ингредиентов антиоксидантных комплексов.

Исходя из этого, в настоящей работе было выполнено сравнение антиоксидантной активности препаратов на основе L-карнитина в эксперименте на двух модельных системах, первая из которых позволяет оценить влияние БАД на железоиндуцированную хемилюминесценцию, вторая – дать характеристику их эффектов в условиях, близких к процессам ПОЛ в биосредах. Протестированы препараты «АндроДоз®» (АО «Нижфарм», Россия) и «Проксид® плюс» (Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc., Италия), широко применяемые в клинической практике для лечения мужского бесплодия. Известно, что L-карнитин является одним из немногих микронутриентов с доказанной эффективностью. L-карнитин и ацил-L-карнитины активируют антиапоптотические, антигликативные, антиоксидантные и противовоспалительные сигналы в половых клетках и репродуктивной системе в целом [208].

Антиокислительные свойства препаратов определяли *in vitro* методом регистрации хемилюминесценции в модельных системах, генерирующих АФК.

Внесение препаратов «АндроДоз®» и «Проксид® плюс» в инкубационную среду в количестве, сопоставимом по содержанию карнитина с его физиологическим уровнем в семенной плазме, угнетало свечение модельной системы. При этом, если «Проксид® плюс» практически полностью ингибировал образование радикалов, то «АндроДоз®» в эквивалентной дозе снижал интенсивность хемилюминесценции лишь на 2/3 от исходной величины.

Приблизительно в тех же пропорциях препараты подавляли интенсивность процессов ПОЛ в модельной системе с липопротеиновыми комплексами, сходными с липидами крови, то есть антиоксидантная активность сохраняется и в физиологических условиях. Установлено также уменьшение величины светосуммы хемилюминесценции при применении указанных биологически активных добавок, что может свидетельствовать об их протективном влиянии на биомембраны.

Таким образом, антиоксидантные свойства препаратов определяются величиной их конечной концентрации в среде инкубации, что применительно к цели их использования, в клинических условиях, в зависимости от уровня в семенной плазме, может сопровождаться не только позитивными, но и негативными эффектами. К их числу относится развитие так называемого «антиоксидантного парадокса», когда введение больших доз препаратов сопровождается незначительным или нулевым лечебным эффектом, что может быть обусловлено резистентностью эндогенных редокс-систем к высоким дозам пищевых антиоксидантов [50, 209]. С этих позиций регулирование уровней эндогенных антиоксидантов (например, путём введения слабых прооксидантов) может быть более полезным подходом к лечению и профилактике инфертильности, чем потребление больших доз антиоксидантов.

В этом контексте показательны результаты глобального опроса 1327 специалистов в области репродукции для определения клинической полезности тестирования на наличие оксидативного стресса и назначения антиоксидантов для лечения мужского бесплодия [210]. Как выяснилось, почти 86% андрологов

регулярно назначают антиоксиданты на курс длительностью от 3 до 6 месяцев. При этом, две трети опрошенных не проводят никаких тестов на наличие оксидативного стресса, то есть имеет место беспричинная и бесконтрольная терапия. Только 19,7% специалистов признают убедительной рекомендацию о необходимости использования антиоксидантов, в то время как 22,2% сочли их бесполезными, а большинство (52,3%) нашли их скромными.

Наряду с этим, несмотря на традиционное представление об окислительном стрессе как основном медиаторе многих форм патологии, включая мужское бесплодие, имеются данные о том, что уровни АФК также повышаются за счет т.н. редуکتивного стресса из-за чрезмерного накопления восстановителей. Эмпирическая антиоксидантная терапия способна привести к истощению физиологических уровней АФК и развитию гипервосстановленного состояния редокс-систем эякулята, то есть явлений редуکتивного стресса как зеркального отражения окислительного стресса с негативными последствиями для детородной функции [28; 211, 212]. С учетом этих данных была сформулирована концепция адекватной контролируемой терапии окислительного стресса. Согласно этой концепции применение антиоксидантов, а также корректировка дозы и режима их назначения, должны сопровождаться обязательным динамическим мониторингом показателей спермограммы и окислительно-восстановительного статуса семенной плазмы.

Таким образом, дезадаптивное перепрограммирование, приводящее к редуکتивному состоянию с перераспределением восстановительных эквивалентов и блокадой физиологического потока свободных радикалов, парадоксальным образом стимулирует патогенные явления, подобные окислительным повреждениям. Поэтому чрезвычайно важно определение характера дисбаланса редокс-систем для выбора вариантов лечения бесплодия в обеих ситуациях редуکتивного/окислительного стресса и управления ими. Как свидетельствуют фактические данные настоящего исследования, необходимо предварительное тестирование антиоксидантных характеристик препаратов *in vitro* для выбора

оптимального подхода к их назначению и профилактике осложнений в виде редуکتивного стресса.

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

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

Результаты настоящего исследования расширили представления об особенностях развития мужского бесплодия, выявили ранее неизвестные патогенетические звенья и специфические мишени для его лечения, что способствует дальнейшему развитию принципов и методов персонализированной и предиктивной медицины.

ВЫВОДЫ

1. Ключевым звеном патогенеза мужского бесплодия является митохондриальная дисфункция сперматозоидов. Она характеризуется нарушением энергетического обеспечения сперматозоидов и проявляется снижением их редокс-потенциала, гипервосстановленным состоянием системы пиридиннуклеотидов, дефицитом АТФ, цАМФ и ионов кальция, дисбалансом ключевых субстратов процесса окисления, недостаточной активностью его ферментов, что в совокупности существенно снижает способность гамет к оплодотворению яйцеклетки.
2. Концентрация кофермента НАД⁺ в диапазоне 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов представляет собой важнейший критерий мужской фертильности, а также чувствительный предиктор позитивного/негативного исхода ЭКО.
3. Обнаружена ассоциация полиморфных локусов rs527236194 гена митохондриального цитохрома В, rs25487*GG и аллеля rs25487*G гена белка репарации ДНК XRCC1 с повышенным риском развития мужского бесплодия.
4. Тесная взаимосвязь между степенью изменения редокс-потенциала эякулята и выраженностью фрагментации ДНК сперматозоидов является основанием для использования этого показателя с целью оценки интенсивности оксидативного стресса как ключевого патогенетического звена развития бесплодия у мужчин с нормальными показателями состояния эякулята (нормозооспермией).
5. Тестирование антиоксидантной активности карнитинсодержащих лекарственных препаратов для лечения мужского бесплодия на использованных в работе модельных системах *in vitro* является условием для рекомендации по их применению при этой форме патологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ	аденозинтрифосфорная кислота
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
АО	антиоксиданты
АФК	активные формы кислорода
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
Г6ФДГ	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГК	гексокиназа
ИДГ	изоцитратдегидрогеназа
ИКСИ	интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ICSI — intracytoplasmic sperm injection)
ИФА	иммуноферментный анализ
МДГ	малатдегидрогеназа
МДА	малоновый диальдегид
НАД ⁺	никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ ⁺	никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
НАДФН	никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НА	никотинамид
мтДНК	митохондриальная ДНК
ОАА	общая антиокислительная активность
ОВП	окислительно-восстановительный потенциал
ПОЛ	перекисное окисление липидов
СДГ	сукцинатдегидрогеназа
ТБК	тиобарбитуровая кислота
ТБК-РП	ТБК-реагирующие продукты

GST	глутатион-S-трансфераза
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
SD	Стандартное отклонение
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
TZI	индекс тератозооспермии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Male infertility / A. Agarwal, S. Baskaran, N. Parekh [et al.] // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397. – № 10271. – P. 319-333.
2. Aitken, R. Sperm DNA integrity: a special issue exploring the causes, consequences, and treatment of DNA damage in human spermatozoa / R. Aitken // *Andrology*. – 2023. – Vol. 11. – № 8. – P. 1541-1544.
3. Medical management of male infertility: now and future / G. Chen, M. Kathrins, S. Ohlander, C. Niederberger // *Current Opinion in Urology*. – 2023. – Vol. 33. – № 1. – P. 10-15.
4. Borght, M. Fertility and infertility: Definition and epidemiology / M. Borght, C. Wyns // *Clinical Biochemistry*. – 2018. – Vol. 62. – P. 2-10.
5. The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology / A. Calogero, R. Cannarella, A. Agarwal [et al.] // *World Journal of Men's Health*. – 2023. – Vol. 41. – № 2. – P. 237-254.
6. Salas-Huetos, A. Male fertility testing - new horizons, ideas and research / A. Salas-Huetos // *Human reproduction*. – 2022. – Vol. 37. – № 1. – P. deac104.062.
7. Semen Thresholds of Normality Established by the WHO Do Not Reveal Genome Instability - A Potential Occult Male Factor / U. Punjabi, I. Goovaerts, K. Peeters, D. De Neubourg // *Genes*. – 2023. – Vol. 14. – P. 239.
8. Осадчук, Л.В. Индивидуальный образ жизни и мужская фертильность / Л. В. Осадчук, А. В. Осадчук // *Физиология человека*. – 2023. – Т. 49. – № 2. – С. 123-136.
9. Exploring the internal exposome of seminal plasma with semen quality and live birth: A Pilot Study / E. Houle, Y. Li, M. Schroder [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2023. – Vol. 69. – P. 4.
10. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017 / H. Sun, T. Gong, Y. Jiang [et al.] // *Aging (Albany NY)*. – 2019. – Vol.11. – № 23. – P. 10952-10991.

11. Barratt, C. 'Man Up': the importance and strategy for placing male reproductive health centre stage in the political and research agenda / C. Barratt, C. De Jonge, R. Sharpe // *Human reproduction*. – 2018. – Vol. 133. – № 4. – P. 541-545.
12. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы / Г.С. Лебедев, Н.А. Голубев, И.А. Шадеркин [и др.] // *Экспериментальная и клиническая урология*. – 2019. – № 4. – С. 4-12.
13. Влияние биологически активной добавки Андродоз на показатели спермограммы у мужчин с идиопатическим бесплодием в форме олигозооспермии в сочетании с астено- и/или тератозооспермией: данные открытого рандомизированного многоцентрового проспективного исследования / В.А. Божедомов, А.А. Камалов, Г.Е. Божедомова [и др.] // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2019. – Т. 20. – №1. – С. 108-119.
14. Male infertility and somatic health - insights into lipid damage as a mechanistic link / N. Burke, B. Nixon, S. Roman [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2022. – Vol. 19. – № 12. – P. 727-750.
15. Grau-Grau, M. Engaged Fatherhood for Men, Families and Gender Equality, Contributions to Management Science / M. Grau-Grau, V. Maestro, H. Bowles (eds). Springer Nature. – 2022. – 323 p.
16. Корнеев, И.А. Терапия мужского бесплодия: анализ исследований / И.А. Корнеев // *Медицинский совет*. – 2019. – № 13. – С. 99-104.
17. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты / Ш.Н. Галимов, В.А. Божедомов, Э.Ф. Галимова [и др.] // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2020. – 208 с.
18. Multiomics analysis of male infertility / X. Wu, L. Zhou, J. Shi [et al.] // *Biology reproduction*. – 2022. – Vol. 107. – № 1. – P. 118-134.
19. Park, Y. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization / Y. Park, M. Pang // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 98-100.

20. Vertika, S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update / S. Vertika, K. Singh, S. Rajender // *Mitochondrion*. – 2020. – Vol. 54. – P. 26-40.
21. Joseph, S. Male Infertility Knowledgebase: decoding the genetic and disease landscape / S. Joseph, S. Mahale // *Database (Oxford)*. 2021. - Vol. 2021. – P. baab049.
22. Keeping the balance in NAD metabolism / Ø. Strømland, M. Niere, Nikiforov A. et al. // *Biochemical Society Transactions*. – 2019. – Vol. 47. – № 1. – P. 119-130.
23. Галимова, Э.Ф. Роль и место никотинамидных коферментов в диагностике бесплодия / Э.Ф. Галимова, Ю.Ю. Громенко, К.Ш. Галимов // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2023. – Т. 18. – № 1(103). – С. 5-8.
24. Srivastava, S. Emerging therapeutic roles for NAD⁺ metabolism in mitochondrial and age-related disorders / S. Srivastava // *Clinical and Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 5. - № 1. – P. 25.
25. The sperm mitochondria: clues and challenges / D. Bucci, M. Spinaci, I. Bustamante-Filho, S. Nesci // *Anim. Reprod*. 2023. – Vol. 19. – № 4. – P. e20220131.
26. Li, G. Sperm mitochondrial DNA and male infertility: An update / Li G., He Y. // *Zhonghua Nan Ke Xue*. – 2017. – Vol. 23. - № 3. – P. 9848-9851.
27. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition / B. Nixon, E. Bromfield, M. Dun [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2015. – Vol. 17. - № 4. – P. 568-573.
28. Oxidative Stress and Idiopathic Male Infertility / P. Sengupta, S. Roychoudhury, M. Nath, S. Dutta // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 1358. – P. 181-204.
29. Mitochondrial Sirtuins in Reproduction / G. Di Emidio, S. Falone, P. Artini [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol.10. - № 7. – P.1047.
30. Association between the single nucleotide variants of the mitochondrial cytochrome B gene (MT-CYB) and the male infertility / M. Jaweesh, M.

- Hammadeh, F. Dahadhah [et al.] // *Molecular biology report.* – 2022. – Vol. 49. – № 5. – P. 3609-3616.
31. Talebi, E. Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility in an Iranian population / E. Talebi, M. Karimian, H. Nikzad // *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis.* – 2018. – Vol. 29. – № 4. – P. 615-623.
32. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and infertility with idiopathic azoospermia in northern Chinese Han males / L. Zheng, X. Wang, D. Zhou [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online.* – 2012. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-407.
33. An In-Depth Bibliometric Analysis and Current Perspective on Male infertility Research / S. Baskaran, A. Agarwal, K. Leisegang [et al.] // *World Journal of Men's Health.* – 2021. – Vol. 39. – № 2. – P. 302-314.
34. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice / A. Agarwal, A. Majzoub, N. Parekh, R. Henkel // *World Journal of Men's Health.* – 2020. – Vol. 38. – № 3. – P. 308-322.
35. A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. / B. Houston, A. Riera-Escamilla, M. Wyrwoll [et al.] // *Human Reproduction Update.* – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 15-29.
36. Aitken, R. The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility / R. Aitken // *Seminars in Reproductive Medicine.* – 2020. – Vol. 38. – № 1. – P. 3-20.
37. Shiraishi, K. Genome medicine in male infertility: From karyotyping to single-cell analysis / K. Shiraishi // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* – 2021. – Vol. 47. – № 8. – P. 2586-2596.
38. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия / В.Н. Павлов, Э.Ф. Галимова, Б.Ф. Терегулов [и др.] // *Вестник урологии.* – 2016. – № 2. – С. 40-49.

39. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome / J. Craig, T. Jenkins, D. Carrell, J. Hotaling // *Fertility and Sterility*. – 2017. – Vol. 107. – P. 848–859.
40. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility/ A. Ilacqua, G. Izzo, G. Pietro Emerenziani [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 115.
41. Aitken, R. The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility – A Unifying Hypothesis? / R. Aitken, M. Baker // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 581838.
42. Krausz, C. Genetics of male infertility / C. Krausz, A. Riera-Escamilla // *Nature Reviews Urology*. – 2018. – Vol. 15. – P. 369-384.
43. Aitken, R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword / R. Aitken, J. Drevet // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – P. 111.
44. Lord, T. Fertilization stimulates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine repair and antioxidant activity to prevent mutagenesis in the embryo / T. Lord, R. Aitken // *Developmental Biology*. – 2015. – Vol. 406 – P. 1–13.
45. Xavier, M. Paternal impacts on development: identification of genomic regions vulnerable to oxidative DNA damage in human spermatozoa / M. Xavier, B. Nixon, S. Roman // *Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 34. – P. 1876–1890.
46. Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? / S. Baskaran, R. Finelli, A. Agarwal, R. Henkel // *Andrologia*. – 2021. – Vol. 53. – № 1. – P. 13577.
47. Ritchie, C. Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility / C. Ritchie, E. Ko // *Review Andrologia*. – 2021. – Vol. 53. - № 1. – P. e13581.
48. Smits, R. Antioxidants for male subfertility / R. Smits, R. Mackenzie-Proctor, A. Yazdani // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2019. – Vol. 3. – H. CD007411.

49. Молекулярные аспекты влияния комплекса Сперотон на мужскую фертильность при идиопатическом бесплодии / Ш.Н. Галимов, Р.М. Ахметов, Э.Ф. Галимова [и др.] // Урология. – 2017. – № 2. – С. 88-92.
50. Henkel, R. The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? / R. Henkel, I. Sandhu, A. Agarwal // *Andrologia*. – 2019. – Vol. 51. – № 1. – P. 13162.
51. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility/ R. Cannarella, R. Condorelli, L. Mongioì [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 5. – P. 1728.
52. Sperm Metabolomics through Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy / M. Lombo, S. Ruiz-Díaz, A. Gutiérrez-Adán [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P.1669.
53. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation / J. Rotondo, C. Lanzillotti, C. Mazziotta [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 689624.
54. McSwiggin, H. Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and male factor infertility / H. McSwiggin, A. O'Doherty // *Reproduction*. – 2018. – Vol. 156. – P. 9-21.
55. Array-based DNA methylation profiling reveals peripheral blood differential methylation in male infertility / S. Sarkar, K. Sujit, V. Singh [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2019. – Vol. 112. – № 1. – P. 61-72.
56. Sperm microRNA pairs: new perspectives in the search for male fertility biomarkers / C. Corral-Vazquez, A. Salas-Huetos, J. Blanco [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2019. – Vol. 112. – № 5. – P. 831-841.
57. The Roles of MicroRNAs in Male Infertility / M. Barbu, D. Thompson, N. Suciú [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – №6. – P. 2910.
58. Optimization of microRNA Acquirement from Seminal Plasma and Identification of Diminished Seminal microRNA-34b as Indicator of Low Semen

- Concentration / M. Eikmans, J. Anholts, L. Blijleven [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 11. – P. 4089.
59. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility / C. Wang, C. Yang, X. Chen [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2011. – Vol. 57. – № 12. – P.1722-31.
60. Особенности ферментного профиля и энергетического статуса спермальной плазмы при идиопатическом бесплодии / Э.Ф. Галимова, В.Н. Павлов, А.З. Абдуллина // *Проблемы репродукции*. – 2013. – № 1. – С. 66-69.
61. Активация ооцитов: фундаментальные и клинические аспекты / Ю.Ю. Громенко, Э.Ф. Галимова, Д.Д. Громенко [и др.] // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. – 2020. – Т. 19. – № 5. – С. 77-85.
62. Mutations in PLCZ1 induce male infertility associated with polyspermy and fertilization failure / Y.Peng, Y.Lin, K.Deng [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2023. – Vol. 40. – № 1. – P. 53-64.
63. Use of phospholipase C zeta analysis to identify candidates for artificial oocyte activation: a case series of clinical pregnancies and a proposed algorithm for patient management / X. Meng, P. Melo, C. Jones [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2020. – Vol. 114. – № 1. – P. 163-174.
64. Молекулярные механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска / Ш.Н. Галимов, Ю.Ю. Громенко, К.Ш. Галимов [и др.] // *Урология*. – 2022. – № 4. – С. 114-117.
65. Kumar, N. Emerging role of Novel Seminal Plasma Biomarkers in Male Infertility: A Review / N. Kumar, N. Singh // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2020. – Vol. 253. – P.170-179.
66. A systematic review identifying fertility biomarkers in semen: a clinical approach through Omics to diagnose male infertility / M. Llavanera, A. Delgado-Bermúdez, J. Ribas-Maynou [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2022. – Vol. 118. – № 2. – P. 291-313.

67. Water- and Fat-Soluble Antioxidants in Human Seminal Plasma and Serum of Fertile Males. / G. Lazzarino, I. Listorti, G. Bilotta [et al.] // *Antioxidants* (Basel). – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 96.
68. Proteolytic degradation of heat shock protein A2 occurs in response to oxidative stress in male germ cells / E. Bromfield, R. Aitken, E. McLaughlin, B. Nixon // *Molecular Human Reproduction*. – 2017. – Vol. 23. – P. 91–105.
69. The molecular evolution of spermatogenesis across mammals / F. Murat, N. Mbengue, S. Winge [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 613. – P. 308–316.
70. Towards a Multi-Omics of Male Infertility / A. Wagner, A. Turk, T. Kunej // *World Journal of Men's Health*. – 2023. – Vol. 41. – P. e21.
71. Прогностические маркеры фертильности и свободнорадикальные нарушения при мужском бесплодии / К.Ш. Галимов, Е.С. Бодрова, С.Ш. Галимова, К.С. Мочалов // Теоретические и прикладные аспекты естественнонаучного образования: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, Чебоксары, 19 мая 2022 года / ЧГПУ им. И.Я. Яковлева; – Чебоксары, 2022.
72. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия / П.Ф. Литвицкий, К.Ш. Галимов, Ю.Ю. Громенко [и др.] // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2022. – Т. 66. – № 2. – С. 72-79.
73. Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters / P. Irigoyen, P. Pintos-Polasky, L. Rosa-Villagran [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 926684.
74. Amor, H. A Systematic Review of the Impact of Mitochondrial Variations on Male Infertility / H. Amor, M. Hammadeh // *Genes* (Basel). – 2022. – Vol. 13. – № 7. – P. 1182.

75. Ford, W. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? / W. Ford // *Human Reproduction Update*. – 2006. – Vol. 12. – № 3. – P. 269-274.
76. Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile / K. Steeghs, F. Oerlemans, B. Wieringa [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2005. – Vol.1230. – P.130–138.
77. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm / G. Takei, D. Miyashiro, C. Mukai, M. Okuno // *Journal of Experimental Biology*. – 2014. – Vol. 217. – №11. – P. 1876-1886.
78. Metabolic regulation is important for spermatogenesis / L. Rato, M. Alves, S. Socorro // *Nature Reviews Urology*. – 2012. – Vol. 9. – № 6. – P. 330-338.
79. Evidence for Rapid Oxidative Phosphorylation and Lactate Fermentation in Motile Human Sperm by Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopy / S. Reynolds, N. Ismail, S. Calvert [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 43226.
80. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? / S. Du Plessis, A. Agarwal, G. Mohanty, V. Linde // *Asian Journal of Andrology*. – 2015. – Vol. 17. – № 2. – P.230-235.
81. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways / A. Amaral, J. Castillo, J. Estanyol [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2013. – Vol. 12. – № 2. – P. 330-342.
82. Saturated fatty acids accelerate linear motility through mitochondrial ATP production in bull sperm / M. Islam, T. Umehara, N. Tsujita [et al.] // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2021. – Vol. 20. – № 3. – P. 289-298.
83. Altered mitochondrial function in spermatozoa from patients with repetitive fertilization failure after ICSI revealed by proteomics / M. Torra-Massana, M. Jodar, M. Barragán [et al.] // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9. – №4. – P. 1192-1204.

84. Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction / W. Kang, Y. Harada, K. Yamatoya [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2020. – Vol. 100. – № 4. – P. 583-595.
85. Proteomic Profile of Sperm in Infertile Males Reveals Changes in Metabolic Pathways / Liang J., Zheng Y., Zeng W. [et al.] // *Protein Journal*. – 2021. – Vol. 40. – № 6. – P. 929-939.
86. Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data / T. Omolaoye, V. Omolaoye, R. Kandasamy [et al.] // *Life*. – 2022. – Vol. 12. – № 2. – P. 1-22.
87. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects / A. Sinha, V. Singh, S. Yadav // *Frontiers in Bioscience*. – 2017. – Vol. 9. – №3. – P. 375-394.
88. In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction / A. Barbonetti, C. Castellini, N. Di Giammarco [et al.] // *Reproductive Toxicology*. – 2016. – Vol. 66. – P. 61-67.
89. Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis / C. Castellini, S. D'Andrea, G. Cordeschi [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 5. – P. 695.
90. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols / R. Aitken, Z. Gibb, L. Mitchell [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2012. – Vol. 87. – № 5. – P. 110.
91. Henkel, R. Oxidants, antioxidants, and impact of the oxidative status in male reproduction / R. Henkel, L. Samanta, A. Agarwal (eds). London, UK: Elsevier. – 2018. – 298 p.
92. Optimizing male fertility: oxidative stress and the use of antioxidants / J. Cardoso, M. Cocuzza, D. Elterman [et al.] // *World Journal of Urology*. – 2019. – Vol. 37. – № 6. – P. 1029-1034.

93. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production / K. Erkkila, S. Kyttanen, M. Wikstrom [et al.] // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2006. – Vol. 290. – № 6. – P. 1145-1154.
94. Mitochondria functionality and sperm quality / A. Amaral, B. Lourenco, M. Marques, J. Ramalho-Santos // *Reproduction*. – 2013. – Vol. 146. – № 5. – P. 163–174.
95. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility / M. Bogueuet, P. Bouet, A. Spiers [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P. 697-719.
96. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: Emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility / C. Tatone, G. Di Emidio, A. Barbonetti [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2018. – Vol. 24. – P. 267–289.
97. The level of secondary messengers and the redox state of $NAD^+/NADH$ are associated with sperm quality in infertility / Sh. Galimov, J. Gromenko, K. Bulygin, K. Galimov, E. Galimova, M. Sinelnikov // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2021. – Vol. 148. – P. 103383.
98. Isocitrate dehydrogenase 3b is required for spermiogenesis but dispensable for retinal viability / S. Zhu, J. Huang, R. Xu [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298. – № 9. – P. 102387.
99. SIRT1: A Key Player in Male Reproduction / M. Khawar, A. Sohail, W. Li [et al.] // *Life (Basel)*. – 2022. – Vol. 12. – № 2. – P. 318.
100. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility / A. Agarwal, S. Roychoudhury, R. Sharma [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2017. – Vol. 34. – P. 48-57.
101. Окислительно-восстановительный потенциал эякулята: значение и принципы коррекции / С.Ш. Галимова, З.Г. Хайбуллина, К.С. Аверьянова,

- К.Ш. Галимов // Уральский научный вестник. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 046-051.
102. Галимова, Э.Ф. Мужская фертильность: модифицируемые и немодифицируемые факторы риска / Э.Ф. Галимова, Ш.Н. Галимов // Проблемы репродукции. – 2015. – Т.21. – № 5. – С. 89-95.
103. Caroppo, E. Sperm redox biology challenges the role of antioxidants as a treatment for male factor infertility / E. Caroppo, M. Dattilo // Fertility and Sterility Reviews. – 2022. – Vol. 3. – № 1. – P. 90-104.
104. Effects of antioxidant co-supplementation therapy on spermatogenesis dysfunction in relation to the basal oxidation–reduction potential levels in spermatozoa: A pilot study / K. Yamasaki, M. Uchida, N. Watanabe [et al.] // Reproductive Medicine and Biology. – 2022. – Vol. 21. – № 1. – P. e12450.
105. Possible Mechanisms of Calcium Action Deficiency in relation to male infertility / A. Kharchegani, M. Mirnamnikha, H. Rahmani [et al.] // International Journal of Fertility & Sterility. – 2019. – Vol. 12. – №4. – P. 267–272.
106. Mitochondrial Ca^{2+} Transport: Mechanisms, Molecular Structures, and Role in Cells / K.N. Belosludtsev, M.V. Dubinin, N.V. Belosludtseva [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2019. – Vol. 84. – P. 593–607.
107. Giorgi, C. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium / C. Giorgi, S. Marchi, P. Pinton // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2018. – Vol. 19. – P. 713–730.
108. Effects of mitochondria-associated Ca^{2+} transporters suppression on oocyte activation / F. Wang, A. Li, Q. Li [et al.] // Cell Biochemistry & Function. – 2021. – Vol. 39. – № 2. – P. 248-257.
109. Costa R., Varanda W. A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells / R. Costa, W. Varanda // Cellular Physiology. – 2010. – Vol. 299. – №2. – P. 316-323.

110. Freitas, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility / M. Freitas, S. Vijayaraghavan, M. Fardilha // *Biology of Reproduction*. – 2017. – Vol. 96. – № 1. – P. 2-12.
111. ATPases, ion exchangers and human sperm motility / R. Peralta-Arias, C. Vivenes, M. Camejo [et al.] // *Reproduction*. – 2015. – Vol. 149. – № 5. – P. 475-484.
112. Yoshida, M. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca^{2+} / M. Yoshida, K. Yoshida // *Molecular Human Reproduction*. – 2011. – Vol. 17. – № 8. – P. 457-465.
113. Kashir, J. Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions / J. Kashir, M. Nomikos, F. Lai // *Advances in Biological Regulation*. – 2018. – Vol. 67. – P. 148-162.
114. World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
115. Антиоксидантные эффекты кумыса: теоретические и клинические аспекты / Э.Ф. Галимова, Р.М. Мухамедзянов, К.С. Мочалов [и др.] // *Мед. вестник Башкортостана*. – 2019. – Т. 14. – № 4(82). – С. 62-65.
116. Utility and Predictive Value of Human Standard Semen Parameters and Sperm DNA Dispersion for Fertility Potential / K. Gill, J. Jakubik, A. Rosiak-Gill [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2019. – Vol. 16. – № 11. – P. 2004.
117. Low NAD^+ Levels Are Associated With a Decline of Spermatogenesis in Transgenic ANDY and Aging Mice / M. Meyer-Ficca, A. Zwerdling, C. Swanson [et al.] // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – P. 896356.
118. Способ диагностики фертильности эякулята при идиопатическом бесплодии / Э.Ф. Галимова, С.Ш. Галимова, К.С. Мочалов, К.Ш. Галимов // Патент РФ на изобретение № 2789239 от 31.01.2023.

119. Influence of Risk Factors for Male Infertility on Sperm Protein Composition / M. Bisconti, J.-F. Simon, S. Grassi [et al.] // *World Journal of Men's Health*. – 2019. – Vol. 37. – № 2. – P.113-127.
120. Advanced molecular approaches in male infertility diagnosis / A. Botezatu, S. Vladioiu, A. Fudulu [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2022. – Vol. 107. – № 3. – P. 684-704.
121. Evaluation of Seminal Fructose and Citric Acid Levels in Men with Fertility Problem / M. Toragall, K. Satapathy, G. Kadadevaru [et al.] // *Journal of Human Reproductive Sciences*. – 2019. – Vol. 12. – № 3. – P. 199-203.
122. Kavanagh, J. Isocitric and citric acids in human prostate and seminal fluid: effects on prostate metabolism and secretion / J. Kavanagh // *Prostate*. – 1994. – Vol. 24. – P. 139-142.
123. Andrade-Rocha, F. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests / F. Andrade-Rocha // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2003. – Vol. 17. – № 6. – P. 247-258.
124. Amaral, A. Energy metabolism in mammalian sperm motility / A. Amaral // *WIREs Mechanisms of Disease*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. e1569.
125. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among tribal populations of India - Country scenario / M. Mukherjee, R. Colah, S. Martin, K. Ghosh // *Indian Journal of Medical Research*. – 2015. – Vol. 141. – № 5. – P. 516-520.
126. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency does not increase the susceptibility of sperm to oxidative stress induced by H₂O₂ / S. Roshankhah, Z. Rostami-Far, F. Shaveisi-Zadeh [et al.] // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. – 2016. – Vol. 43. – № 4. – P. 193-198.
127. Особенности метаболического состава спермальной плазмы при различных морфофункциональных патологиях эякулята / О.А. Гусякова, С.И. Мурский, Г.В. Тукманов, М.В. Комарова // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2019. – Т. 64. – № 8. – С. 469-476.

128. Ghaffari, M. The effect of cigarette smoking on human sperm creatine kinase activity: as an ATP buffering system in sperm / M. Ghaffari, M. Rostami // *International Journal of Fertility & Sterility*. – 2013. – Vol. 6. – № 4. – P. 258.
129. Semen Creatine and Creatine Kinase Activity as an Indicator of Sperm Quality / F. Nasrallah, M. Hammami, S. Omar [et al.] // *Clinical Laboratory*. – 2020. – Vol. 66. – P. 9.
130. Ostojic, S. Creatine as a Promising Component of Paternal Preconception Diet / S. Ostojic, T. Stea, D. Engeset // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 586.
131. Gonçalves, V. Mitochondrial Genetics / V. Gonçalves // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. – Vol. 1158. – P. 247-255.
132. Gunes, S. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility / S. Gunes, M. Al-Sadaan, A. Agarwal // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2015. – Vol. 31. – № 3. – P. 309-319.
133. ADP-ribosylation signalling and human disease / L. Palazzo, P. Mikolčević, A. Mikoč, I. Ahel // *Open Biology*. – 2019. – Vol. 9. – № 4. – P. 190041.
134. Association between polymorphisms in the XRCC1 gene and male infertility risk: A meta-analysis / Z. Liu, L. Lin, X. Yao, J. Xing // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – Vol. 99. – № 18. – P. e20008.
135. Фархутдинов, Р.Р. Свободнорадикальное окисление в норме и патологии / Р.Р. Фархутдинов, Ш.Н. Галимов, Э.Ф. Галимова // *Практикующий врач сегодня*. – 2010. – № 2. – С. 54–61.
136. World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021.
137. The 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts and Their Biological Relevance: Are Some Proteins Preferred Targets? / L. Milkovic, N. Zarkovic, Z. Marusic [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2023. – Vol. 12. – № 4. – P. 856.

138. Pharmacological inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase protects human spermatozoa against oxidative stress / J. Walters, G. De Iuliis, M. Dun [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2018. – Vol. 98. – № 6. – P. 784-794.
139. Oxidative Stress in the Male Germline: A Review of Novel Strategies to Reduce 4-Hydroxynonenal Production / J. Walters, G. De Iuliis, B. Nixon, E. Bromfield // *Antioxidants (Basel)*. – 2018. – Vol. 7. – № 10. – P. 132.
140. Sperm protein carbonylation / S. Lone, T. Mohanty, R. Baithalu, H. Yadav // *Andrologia*. – 2019. – Vol. 51. – № 4. – P. e13233.
141. Differences in sperm protein abundance and carbonylation level in bull ejaculates of low and high quality / A. Mostek, B. Westfalewicz, M. Słowińska [et al.] // *PLOS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 11. – P. e0206150.
142. A method to produce fully characterized ubiquitin covalently modified by 4-hydroxy-nonenal, glyoxal, methylglyoxal, and malondialdehyde / M. Colzani, A. Criscuolo, G. Casali [et al.] // *Free Radical Research*. – 2016. – Vol. 50. – № 3. – P. 328-36.
143. Alteration of RNA modification signature in human sperm correlates with sperm motility / H. Guo, X. Shen, H. Hu [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2022. – Vol. 28. – № 9. – P. gaac031.
144. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems / G. Collodel, E. Moretti, L. Micheli [et al.] // *Andrology*. – 2015. – Vol. 3. – № 2. – P. 280-286.
145. Marinaro, J. Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines / J. Marinaro, P. Schlegel // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 2. – P. 1446.
146. Lifestyle-, environmental-, and additional health factors associated with an increased sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis / A. Szabó, S. Váncsa, P. Hegyi [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 5.

147. Фрагментация ДНК сперматозоидов: связь с мужским бесплодием и методы коррекции / И.Д. Громенко, Э.Ф. Галимова, Р.И. Громенко, К.Ш. Галимов, П.Ф. Литвицкий // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67. – № 3. – С. 142-148.
148. Гяургиев, Т.А. Современный взгляд на применение антиоксидантов в терапии мужского бесплодия / Т.А. Гяургиев, А.В. Кузьменко, В.В. Кузьменко // Урология. – 2020. – № 6. – С.142-147.
149. The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and infertility (MOXI) randomized clinical trial / A. Steiner, K. Hansen, K. Barnhart et al. // Fertility and Sterility. – 2020. – Vol. 113. – P. 552.e3–560.e3.
150. Oxidative versus reductive stress: a delicate balance for sperm integrity / N. Sadeghi, G. Boissonneault, M. Tavalaei, M. Nasr-Esfahani // Systems Biology in Reproductive Medicine. – 2023. – Vol. 69. – № 1. – P. 20-31.
151. Double-blind, randomised, placebo-controlled trial on the effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia / S. Micic, N. Lalic, D. Djordjevic [et al.] // Andrologia. – 2019. – Vol. 51. – № 6. – P. 13267.
152. Влияние биологически активных добавок на основе L-карнитина на свободнорадикальные процессы в модельных системах / Ш.Н. Галимов, Ю.Ю. Громенко, И.Д. Громенко [и др.] // Вестник урологии. – 2021. – Т. 9. – № 4. – С. 21-29.
153. Прогностические маркеры фертильности и свободнорадикальные нарушения при мужском бесплодии / К.Ш. Галимов, Е.С. Бодрова, С.Ш. Галимова, К.С. Мочалов // Теоретические и прикладные аспекты естественнонаучного образования. Мат. Всероссийской научно-практической конференции. – 2022. – С. 120-124.
154. EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health. EAU Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male

- Infertility / Minhas S., Bettocchi C., Boeri L. [et al.] // *European Urology*. – 2021. – Vol. 80. – № 5. – P. 603-620.
155. Sengupta, P. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015 / P. Sengupta, S. Dutta, E. Krajewska-Kulak // *American Journal of Men's Health*. – 2017. – Vol. 11. – № 4. – P. 1279-1304.
156. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия / П.Ф. Литвицкий, К.Ш. Галимов, Ю.Ю. Громенко [и др.] // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2022. – Т. 66. – № 2. – С. 72-79.
157. Авадиева, Н.Э. Применение ДНК фрагментации спермы в андрологической практике / Н.Э. Авадиева // *Вестник урологии*. – 2019. – Т. 7. – № 1. – С. 7-11.
158. ATP activation of peritubular cells drives testicular sperm transport / D. Fleck, L. Kenzler, N. Mundt [et al.] // *Cell Biology*. – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 1-30.
159. Metabolic Dysregulation and Sperm Motility in Male Infertility / S. Maurya, K. Kesari, S. Roychoudhury [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 1358. – P. 257-273.
160. Tatone, C. Mitochondria Biology in Reproductive Function / C. Tatone, G. Di Emidio // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11. – № 10. – P. 1978.
161. Age-Related Decline of Male Fertility: Mitochondrial Dysfunction and the Antioxidant Interventions / J. Wang, S. Wang, Y. Feng [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2022. – Vol. 15. - № 5. – P. 519.
162. Association between Seminal Oxidation-Reduction Potential and Sperm DNA Fragmentation - A Meta-Analysis / M. Panner Selvam, S. Baskaran, S. O'Connell [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11. – № 8. – P. 1563.
163. An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation) / F. Peña, J. Ortiz-Rodríguez, G.

- Gaitskell-Phillips [et al.] // *Animal Reproduction Science*. – 2022. – Vol. 246. – P. 106805.
164. Aberrant expression of spermspecific glycolytic enzymes are associated with poor sperm quality / X. Liu, Q. Li, W. Wang, F. Liu // *Molecular Medicine Reports*. – 2019. – Vol. 19. – № 4. – P. 2471-2478.
165. Галимов, К.Ш. Функциональная активность митохондрий при идиопатическом бесплодии у мужчин / К.Ш. Галимов, Г.Р. Гилязова, Э.Д. Щербакова // *Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: Материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей*. С-Пб, 2022. – С. 282.
166. Spermatid mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment / J. Losano, D. Angrimani, R. Ferreira Leite [et al.] // *Zygote*. – 2018. – Vol. 26. – № 4. – P. 251-260.
167. Martínez-Reyes, I. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease / I. Martínez-Reyes, N. Chandel // *Nature Communication*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 102.
168. Biphasic role of Ca in signaling pathways for increasing the capacity of mouse spermatozoa / F.A. Navarrete, F.A. Garcia-Vasquez, A. Alvau [et al.] // *Journal Cellular Physiology*. – 2015. – Vol. 230. – № 8. – P. 1758-1769.
169. Correia, J. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm / J. Correia, F. Michelangeli, S. Publicover // *Reproduction*. – 2015. – Vol.150. – №2. – P. 65.
170. Localization, Distribution, and Function of the Calcium-Sensing Receptor in Sperm / F. Mendoza, C. Perez-Marin, L. Garcia-Marin [et al.] // *Andrology*. – 2011. – Vol. 33. – № 1. – P. 96-104.
171. ATP increases head volume in capacitated human sperm via a purinergic channel / I. Lopez-Gonzalez, C. Sánchez-Cárdenas, J. De la Vega-Beltrán [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2023. – Vol. 671. – P. 318-326.

172. The central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology / M. Buffone, E. Wertheimer, P. Visconti, D. Krapf // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1842. – P. 2610–2620.
173. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation / C. Alonso, C. Osycka-Salut, L. Castellano [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2017. – Vol. 23. – № 8. – P. 521-534.
174. Non-invasive In-cell Determination of Free Cytosolic [NAD⁺]/[NADH] Ratios Using Hyperpolarized Glucose Show Large Variations in Metabolic Phenotypes / C. Christensen, M. Karlsson, J. Winther [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. - № 4. – P. 2344-2352.
175. Regulation of Ion Channels by Pyridine Nucleotides / P. Kilfoil, S. Tipparaju, O. Barski, A. Bhatnagar // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 112. – № 4. – P. 721-741.
176. Waddell, J. Cellular and Mitochondrial NAD Homeostasis in Health and Disease / J. Waddell, R. Khatoon, T. Kristian // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 9. – P. 1329.
177. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD⁺, NADH, or their ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* / K. Anderson, A. Madsen, C. Olsen, M. Hirschey // *Bioenergetics*. – 2017. – Vol. 1858. – № 12. – P. 991.
178. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺): essential redox metabolite, co-substrate and an anti-cancer and anti-ageing therapeutic target / H. Griffiths, C. Williams, S. King, S. Allison // *Biochemical Society Transactions*. – 2020. – Vol. 48. – № 3. – P. 733-744.
179. Li, F. Targeting NAD Metabolism for the Therapy of Age-Related Neurodegenerative Diseases / F. Li, C. Wu, G. Wang // *Neuroscience Bulletin*. – 2023. doi: 10.1007/s12264-023-01072-3.
180. Lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) is essential for the sperm count and motility: A case-control study / A. Saeed, S. Rayah, S. Usama [et al.] // *Baghdad*

- Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences. – 2021. – Vol. 2. – № 3. – P. 147-159.
181. Brooks, G. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory / G. Brooks // *Cell Metabolism*. – 2018. – Vol. 27. – P. 757-765.
182. Skinner, W. Mitochondrial uncouplers impair human sperm motility without altering ATP content / W. Skinner // *Biology of Reproduction*. – 2023. – Vol. 109. – № 2. – P. 192-203.
183. Investigating the Glycating Effects of Glucose, Glyoxal and Methylglyoxal on Human Sperm / C. Nevin, L. McNeil, N. Ahmed [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 9002.
184. Methylglyoxal interaction with superoxide dismutase 1 / P. Polykretis, E. Luchinat, F. Boscaro, L. Banci // *Redox Biology*. – 2020. – Vol. 30. – P. 101421.
185. Allaman, I. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis / I. Allaman, M. Bélanger, P. Magistretti // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 23.
186. Banihani, S. Caffeine increased progressive motility of human spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic semen samples and enhanced activity of seminal creatine kinase / S. Banihani, H. Khaled // *Andrologia*. – 2021. – Vol. 53. – № 6. – P. 14052.
187. Effect of Serum and Seminal Creatine kinase, (CK) on Sperm Chemotherapy as a cause of low serum creatine kinase activity [Letter] // *Clinical Chemistry*. – 2022. – Vol. 26. – P. 1629-1630.
188. A lack of a definite correlation between male sub-fertility and single nucleotide polymorphisms in sperm mitochondrial genes MT-CO3, MT-ATP6 and MT-ATP8 / M. Jaweesh, M. Hammadeh, F. Dahadhah [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2022. – Vol. 49. – P. 10229–10238.
189. Associations of mitochondrial haplogroups and mitochondrial DNA copy numbers with end-stage renal disease in a Han population / Y. Zhang, Y. Zhao, S. Wen [et al.] // *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*. – 2017. – Vol. 28. – № 5. – P. 725-731.

190. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements / P. Lestienne, P. Reynier, M. Chrétien [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 1997. – Vol. 3. – № 9. – P. 811-814.
191. Male infertility is significantly associated with multiple deletions in an 8.7-kb segment of sperm mtDNA in Pakistan / I. Mughal, A. Irfan, S. Jahan, A. Hameed // *Turkish Journal of Medical Sciences*. – 2017. – Vol. 47. – № 3. – P. 928-933.
192. Sperm mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity / A. Rosati, B. Whitcomb, N. Brandon [et al.] // *Human Reproduction*. – 2020. – Vol. 35. – № 11. – P. 2619-2625.
193. Association between sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate and industrial air pollution dynamics / M. Vozdova, S. Kubickova, V. Kopecka [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – P. 8324.
194. Effects of The Mitochondrial Genome on Germ Cell Fertility: A Review of The Literature / R. Darehbagh, B. Khalafi, A. Allahveisi, M. Habiby // *International Journal of Fertility & Sterility*. – 2022. – Vol. 16. – № 2. – P. 70-75.
195. Мутации гена митохондриального цитохрома В (MT-CYB) в сперматозоидах пациентов из бесплодных семейных пар / К.Ш. Галимов, Ю.Ю. Громенко, И.Р. Гилязова, П.Ф. Литвицкий // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2023. – Т. 67. – № 1. – С. 21-27.
196. Способ прогнозирования идиопатического мужского бесплодия на основе анализа нуклеотидных вариантов в гене митохондриального цитохрома в / Э.Ф. Галимова, С.Ш. Галимова, К.С. Мочалов, Ш.Н. Галимов, К.Ш. Галимов // Патент РФ на изобретение № 2800406 от 21.07.2023.
197. Omics in Seminal Plasma: An Effective Strategy for Predicting Sperm Retrieval Outcome in Non-obstructive Azoospermia / R. Zarezadeh, S. Nikanfar, H. Oghbaei [et al.] // *Molecular Diagnosis & Therapy*. – 2021. – Vol. 25. – №3. – P. 315-325.

198. Potential of Mitochondrial Genome Editing for Human Fertility Health / L. Fu, Y. Luo, Y. Liu [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – P. 673951.
199. SNPs in ERCC1, ERCC2, and XRCC1 genes of the DNA repair pathway and risk of male infertility in the Asian populations: association study, meta-analysis, and trial sequential analysis / V. Singh, S. Bansal, D. Sudhakar [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2019. – Vol.36. – P. 79–90.
200. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and LIG4 and idiopathic male infertility / H. Ghasemi, I. Khodadadi, A. Fattahi [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2017. – Vol. 63. – P. 382–90.
201. The Possible Role of XRCC1 Gene Polymorphisms with Idiopathic Non-obstructive Azoospermia in Southeast Turkey / H. Akbas, M. Balkan, M. Binici, A. Gedik // *Urology Journal*. – 2019. – Vol. 16. – № 4. – P. 380-385.
202. Role of XRCC1, XPC, NBN gene polymorphisms in spermatogenesis / T.A. Sherchkova, M.A. Amelina, S.V. Lomteva [et al.] // *Gene Reports*. – 2021. – Vol. 24. – P. 101238.
203. Sperm Motility Annotated Genes: Are They Associated with Impaired Fecundity? / M. Abu-Halima, L. Becker, M. Al Smadi [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 9. – P. 1239.
204. Епанчинцева, Е.А. Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов - необходимость для современной клинической практики / Е.А. Епанчинцева, В.Г. Селятицкая, В.А. Божедомов // *Андрология и генитальная хирургия*. 2020. Т. 21, № 1. С. 14-21.
205. Плосконос, М.В. Апоптоз и мужская фертильность / М.В. Плосконос. – Астрахань, 2016. – 225 с.
206. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. Aaronson [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2018. – Vol. 25. – № 3. – P. 486-541.

207. Nicotinamide mononucleotide improves spermatogenic function in streptozotocin-induced diabetic mice via modulating the glycolysis pathway / D. Ma, L. Hu, J. Wang [et al.] // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*. – 2022. – Vol. 54. – № 9. – P. 1314-1324.
208. Carnitines as Mitochondrial Modulators of Oocyte and Embryo Bioenergetics / M. Placidi, G. Di Emidio, A. Virmani [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11. – № 4. – P. 745.
209. Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? / B. Halliwell // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2013. – Vol.75. – № 3. – P. 637-644.
210. A Global Survey of Reproductive Specialists to Determine the Clinical Utility of Oxidative Stress Testing and Antioxidant Use in Male Infertility / A. Agarwal, R. Finelli, M. Selvam [et al.] // *World Journal of Men's Health*. – 2021. – Vol. 39. – № 3. – P. 470–488.
211. Reactive oxygen species and male reproductive hormones / M. Darbandi, S. Darbandi, A. Agarwal [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 87.
212. Serafini, S. Redox Regulation to Modulate Phosphorylation Events in Human Spermatozoa / S. Serafini, C. O'Flaherty // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2022. – Vol. 37. – № 7-9. – P. 437-450.
213. Компьютерный анализ эякулята CASA: преимущества и перспективы / К.Ш. Галимов, И.Д. Громенко, Д.Д. Громенко, Э.М. Муратов, П.Ф. Литвицкий // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2023. – Т. 18. – № 1 (103). – С. 92-95.