

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Южный федеральный университет»

На правах рукописи

Савикина Ксения Геннадьевна

**Генетические предикторы предрасположенности и особенности развития  
окислительного стресса при патозооспермии**

**03.02.07 – генетика**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону - 2022

Работа выполнена в лаборатории биологии развития и организации генома кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

**Научный руководитель:** **Шкурят Татьяна Павловна,**  
доктор биологических наук, профессор, Южный федеральный университет, кафедра генетики, профессор

**Официальные оппоненты:** **Курило Любовь Федоровна,**  
доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова»

**Амелина Светлана Сергеевна,**  
доктор медицинских наук, профессор, «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гематологии и трансфузиологии

Защита диссертации состоится **29 сентября 2022 г. в 15:30** на заседании диссертационного совета ЮФУ03.02 по биологическим наукам на базе Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 712.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р.Зорге, 21Ж и на сайте Южного федерального университета <https://hub.sfedu.ru/diss/show/1299802/>

Автореферат разослан «\_\_» августа 2022 г.

Отзыв на автореферат в 2-х экз. (с указанием даты, полностью ФИО, учёной степени со специальностью, звания, организации, подразделения, должности, адреса, телефона, e-mail), заверенный печатью организации, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 106, ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ03.02 Бутенко Е.В., а также в формате .pdf на e-mail: [evbutenko@sfedu.ru](mailto:evbutenko@sfedu.ru)

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Бутенко Елена Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Бесплодие стало проблемой глобального здравоохранения, от которой страдают 187 миллионов пар во всем мире, или каждая шестая пара репродуктивного возраста (Agarwal A et al., 2020). Инфертильность представляет собой широкий спектр биологический, социокультурных, психологических, экологических и финансовых проблем (Choy J.T. Eisenberg M.L., 2018; Божедомов В.А. и др, 2020). Несмотря на свою многогранную природу, мужское бесплодие еще не до конца изучено, и примерно половина случаев считается необъяснимой (идиопатическое мужское бесплодие) (Bracke A. et al., 2018). Исследование условий, которые ставят под угрозу мужскую фертильность, обычно проводятся с помощью сбора анамнеза, физического осмотра и анализа эякулята. Примерно в 15% случаев результаты обычной спермограммы не выявляют явных отклонений (Barratt C.L.R. et al., 2017). Однако было показано, что сперматозоиды бесплодных мужчин имеют более низкую целостность ДНК, чем фертильных. Это важно, потому что генетическая информация, передаваемая следующему поколению, зависит от целостности ДНК сперматозоидов (Wiweko B., Utami P., 2017; Cannarella r. et al., 2020; Selvam M., Sengupta P., Agarwal A., 2020).

Окислительный стресс был признан как основной фактор в различных этиологиях мужского бесплодия (Agarwal et al., 2020; Божедомов В.А., 2020). Он возникает, когда активные формы кислорода (АФК) и уровни других свободных радикалов значительно увеличены, уровень антиоксидантов существенно снижается, что нарушает баланс между окислителями и антиоксидантами (Agarwal A. et al., 2020).

Антиоксидантные ферменты играют решающую роль в защите от окислительного стресса во время сперматогенеза и оплодотворения (García Rodríguez A. et al., 2019; Yin Y. et al., 2020; Mahbouli S. et al., 2021). Поскольку заболеваемость мужчин бесплодием продолжает увеличиваться, анализ его ассоциации с полиморфными вариантами антиоксидантных генов поможет не только понять роль антиоксидантной сигнальной сети в мужском бесплодии, связанном с АФК, но также способствуют проверке потенциала как генетических маркеров для диагностики мужского бесплодия в клинической практике.

**Цель работы:** исследовать полиморфные варианты генов *SOD1*, *CAT*, *hOGG1*, *NOS3* и *PON1* их ассоциации с гормональным фоном и окислительным статусом семенной жидкости при различных формах патозооспермии.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить интенсивность свободно-радикальных процессов в эякуляте пациентов с патозооспермией.
2. Изучить гормональный профиль спермы у мужчин с нормозооспермией и при различных типах патозооспермии, в том числе, уровень тестостерона, эстрадиола, антимюллерова гормона, инсулиноподобного фактора роста 1,

тиреотропин-рилизинг гормона, белка 1, связывающего инсулиноподобный фактор роста и дигидротестостерона.

3. Изучить частоту встречаемости генотипов и полиморфных локусов генов *SOD1*, *CAT*, *hOGG1*, *NOS3* и *PON1* у мужчин с различными типами патозооспермии.

4. Провести исследование межгенных взаимодействий полиморфных локусов генов *SOD1*, *CAT*, *hOGG1*, *NOS3* и *PON1*, ассоциированных с различными типами патозооспермии.

5. Провести многофакторный анализ для выявления корреляции между персонифицированным генотипом по изучаемым полиморфным вариантам генов, уровнем гормонов и интенсивностью свободно-радикальных процессов в эякуляте.

### **Научная новизна работы**

На основе молекулярно-генетических, морфологических, биохимических и биофизических методов проведены многопараметрические исследования и выявлены ассоциации между некоторыми полиморфными вариантами генов антиоксидантной защиты, нарушением подвижности и числа сперматозоидов, уровнем гормонов и интенсивностью свободнорадикальных процессов в эякуляте бесплодных мужчин. Впервые определен уровень TRH в спермальной жидкости при различных типах патозооспермии и полиморфных вариантах генов окислительного стресса. Впервые показано, что риск возникновения олигозооспермии выше у лиц с носительством полиморфного варианта *hOGG1 Ser326Cys* (rs1052133). Впервые показано, что риск развития любого типа патозооспермии повышается при сочетании полиморфных вариантов *NOS3T786TxPON1 Arg192Glu* и увеличении интенсивности хемилюминесценции. Впервые проведен многопараметрический анализ взаимосвязей между генотипом, окислительным стрессом и гормональным фоном у пациентов с патозооспермией.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. У пациентов с патозооспермией наблюдается нарушение редокс-гомеостаза эякулята, подтвержденное достоверным повышением параметров активированной ХЛ, что свидетельствует об интенсификации свободно-радикальных процессов на фоне снижения емкости антиоксидантной системы спермы. При этом в эякуляте мужчин с олиго- и олигоастенозооспермией параметры ХЛ в 1,5-2,1 раза выше, чем в группе с нормозооспермией. При тератозооспермии и астенозооспермии параметры ХЛ эякулята возрастают не более, чем на 50% относительно нормы.

2. При патозооспермии наблюдается существенный дисбаланс гормонального профиля эякулята инфертильных мужчин. При снижении подвижности сперматозоидов повышается уровень тестостерона, эстрадиола, инсулиноподобного фактора роста<sup>1</sup>, но снижается содержание тиреотропин-рилизинг-гормона. При уменьшении количества сперматозоидов происходит

снижение уровня тиреотропин-рилизинг-гормона и отмечена тенденция к снижению содержания DHT, IGF1, IGF1BP1 и AMH. При нарушении морфологии сперматозоидов отмечено повышение уровня тестостерона и IGF1 на фоне тенденции к снижению содержания DHT, IGF1BP1 и AMH. Обнаружены корреляционные зависимости в изменении гормонального профиля при нормозооспермии и патозооспермии.

3. Риск развития олигозооспермии повышается при наличии в генотипе полиморфного варианта *hOGG1 Ser326Cys (rs1052133)*.
4. Риск развития любого типа патозооспермии повышается при сочетании полиморфных вариантов *NOS3T786TxPON1Arg192Glu* и увеличении интенсивности хемилюминесценции.
5. При олигозооспермии и астенозооспермии возрастает роль полиморфных вариантов генов, происходит снижение вклада оценки уровня интенсивности свободно-радикальных процессов, а уровень содержания гормонов остается главной компонентой в оценке нормо – и патозооспермии.

#### **Научно-практическое значение.**

Научный вклад работы заключается в раскрытии механизмов межгенных взаимодействий генов-кандидатов при развитии патозооспермии у мужчин с бесплодием. Получены новые данные о роли полиморфных вариантов генов ферментов антиоксидантной системы, ассоциированных с мужским бесплодием. Получены новые данные о механизмах регуляции ОС при патозооспермии. Проведена оценка связи молекулярно-генетических маркеров, интенсивности свободно-радикальных процессов и гормонального профиля эякулята у пациентов с патозооспермией.

Практическая ценность работы заключается в нахождении предикторов для оценки риска развития бесплодия у мужчин, имеющих в генотипе полиморфные варианты генов антиоксидантных ферментов. Был создан банк образцов эякулята фертильных доноров спермы и мужчин с бесплодием. Этот материал может быть использован в будущих исследованиях генетических причин развития мужского бесплодия.

Полученные в процессе написания диссертации результаты, внедрены в клиничко-лабораторную работу лабораторий «Наука» (г. Ростов-на-Дону) и «Лабораторные технологии» (г. Ростов-на-Дону), в клиническую практику медицинских учреждений «Центр репродукции человека и ЭКО» (г. Ростов-на-Дону) и «ДиагностикЛаб» (г. Ростов-на-Дону). Научные данные используются в учебном процессе Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ при чтении курса лекций «Биология индивидуального развития», «Генетика пола и репродукции», «Генетические основы здоровья человека» и «Генетика старения».

Работа выполнена при финансовой помощи Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках следующих проектов:

государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации по темам: «Поиск новых мишеней для предиктивной диагностики заболеваний репродуктивной системы» (ГК№:6.703.2014/К.);

гранта РФФИ №16-34-01108\16 «Исследование роли генетических факторов в процессах фолликулогенеза и имплантации эмбриона человека», 2016-2017гг;

в рамках базовой части госзадания МОН РФ № 6.6762.2017/БЧ по теме: "Исследование функциональной роли генетических полиморфизмов и микроРНК в геноме человека и животных", 2017-2019гг;

международного гранта Южного федерального университета совместно с кафедрой генетики Ереванского университета грант Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №: ВнГр-07/2017-34 «Поиск новых молекулярных мишеней для предиктивной диагностики мужского бесплодия», 2017-2018гг;

гранта №0852-2020-0028 Министерства науки и высшего образования РФ "Биохимические и молекулярно-генетические исследования механизмов патологических процессов, ассоциированных с социально-значимыми заболеваниями» 2020-2022 гг.

Экспериментальные исследования выполнены на кафедре генетики и уникальном оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на XXI Международной молодёжной научной конференции студентов, аспирантов, и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 7-11 апреля 2014г.), II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 13-16 октября 2015г.), XXV Международной конференции «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Сочи, 9-12 сентября 2015 г.), XXVI Международной конференции «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Москва, 7-10 сентября 2016г.), 7th Singapore Health & Biomedical Congress 2016 (Сингапур, 23-24 сентября 2016г.), XVI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 27-30 сентября 2016г), XXVII Международной конференции «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Санкт-Петербург, 6-9 сентября 2017г.), научно-практической конференции с международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 26-29 сентября 2019г.), а также на заседаниях и коллоквиумах кафедры генетики ЮФУ (Ростов-на-Дону, 2022).

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа основана на оригинальном материале, полученном лично автором экспериментальных исследований в период с 2014 по 2020 гг. Тема исследования, цель, задачи, объекты и методы выбраны автором совместно с научным руководителем. Все экспериментальные работы выполнены лично автором на базе лаборатории биологии развития и организации генома кафедры генетики ЮФУ, а также

лаборатории эмбриогенеза ООО «ЦЕНТР РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА И ЭКО». Анализ полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений выполнены автором работы при корректирующем участии научного руководителя.

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ, из них 1 работа в изданиях, входящих в базу данных международных индексов научного цитирования Scopus, 2 работы входит в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 119 страницах, содержит 19 таблиц, 15 рисунков. Список использованной литературы включает 307 источников, в том числе 225 на иностранных языках.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

*Дизайн исследования:* одномоментное исследование, исследование «случай-контроль».

*Критерии включения:* мужчины, в возрасте от 23 до 48 лет, соматически здоровые, с патозооспермией и бесплодием в анамнезе. Группу контроля составили фертильные доноры спермы такой же возрастной группы.

*Критерии исключения:* мужчины с диагнозом азооспермия, моногенными болезнями, хромосомными патологиями, воспалительными процессами разной этиологии, а также мужчины из пар с доказанным женским бесплодием.

*Продолжительность исследования:* октябрь 2014 – декабрь 2019.

*Формирование выборки исследования:* в период исследования в ООО «Центр репродукции человека и ЭКО» поступило 788 мужчин с проблемой бесплодия в браке. Все испытуемые проходили анкетирование, медицинский осмотр врачом-андрологом и лабораторное исследование эякулята (спермограмма).

На основе спермограммы, согласно пятому руководству ВОЗ (WHO, 2010) нами были отобраны пять исследуемых групп: контроль (фертильные доноры), астенозооспермия, олигозооспермия, тератозооспермия и олигоастенозооспермия.

Анализ хемилюминесценции (ХЛ) в спермальной плазме пациентов проводили на приборе AutoLumat Pius LB953 (Germany). Для подсчета фотонов применяли ФЭУ-37 (Россия).

Методом иммуноферментного анализа определяли уровень тиреотропин-рилизинг-фактора (TRH), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), белок-1 связывающего инсулиноподобного фактора роста (IGFBP1), тестостерона (TTST), эстрадиола (E2), антимюллерова гормона (АМН) и дигидротестостерона (DHT) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ALISEI QS» (Италия) ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ.

В работе были исследованы полиморфные варианты генов *PON1 Q192R* (rs662), *SOD1 G7958A* (rs4998557), *CAT C262T* (rs1001179), *NOS3 C786T* (rs2070744) и *hOGG1 Ser326Cys* (rs1052133).

Выделение ДНК проводили с использованием набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (Россия). Для выявления полиморфных вариантов генов проводили ПЦР, используя прямой и обратный праймеры из набора SNP-экспресс «Литех» (Россия).

Распределение частот генотипов и аллелей соответственно равновесию Харди-Вайнберга определяли в программе «Hardy-Weinberg equilibrium calculator». С помощью критерия  $\chi^2$  проводили оценку различий в распределении аллельных вариантов в исследуемых группах. По отношению шансов (OR-odds ratio, с 95% доверительным интервалом (CL)) судили о риске развития патозооспермии. Моделирование межгенных взаимодействий полиморфных локусов изучаемых генов проводили с помощью программы «Multifactor Dimensionality Reduction». Анализ биохимических и генетических параметров, их взаимосвязи и изменений в процессе сперматогенеза был выполнен с помощью мультифакторного анализа (Multiple factor analysis).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Интенсивность свободно - радикальных процессов в семенной жидкости мужчин с различными типами патозооспермии

Динамику изменений редокс-гомеостаза спермоплазмы оценивали по высоте быстрой вспышки (H) и светосумме (Sm) активированной ХЛ. В таблице 1 представлены результаты исследования люминолзависимой ХЛ эякулята пациентов с различными типами патозооспермии.

Таблица 1

#### Интенсивность свободно-радикальных процессов в эякуляте инфертильных мужчин с различными типами патозооспермии.

Исследуемые группы	Показатели хемилюминесценции эякулята			
	Высота светосуммы быстрой вспышки H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (p)	Светосумма свечения за 10 сек. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (p)
Нормозооспермия	11,78±0,92		30,05±2,36	
Олигоастенозооспермия	19,82±2,86	<0,02	45,6±2,66	<0,02
Астенозооспермия	17,25±1,89	<0,02	42,37±2,68	<0,02
Олигозооспермия	24,44±3,06	<0,02	57,01±2,29	<0,02
Тератозооспермия	16,72±2,43	>0,05	38,89±2,82	>0,05

У всех мужчин с патозооспермией, независимо от ее типа, наблюдается достоверное повышение интенсивности свободно-радикальных процессов. При



этом, в спермоплазме мужчин с олигоастенозооспермией и олигозооспермией высота быстрой вспышки практически в два раза выше по сравнению с нормозооспермией и равна  $19,82 \pm 2,86$  и  $24,44 \pm 3,06$  мм – соответственно. При астенозооспермии высота быстрой вспышки была увеличена на 46%, а при тератозооспермии на 42% по сравнению с контролем (Савикина К.Г., 2015).

Как видно, из полученных данных, если при нормозооспермии индивидуальные различия в величине импульса светосуммы быстрой вспышки варьировали в пределах  $7,4 \pm 18,8$  (отн. ед. ХЛ), то при астенозооспермии у отдельных пациентов значения этого показателя достигали 36,9 (отн. ед. ХЛ), при тератозооспермии до 41,3, при олигоастенозооспермии до 52,1; при олигозооспермии до 56,4 (отн. ед. ХЛ) (Савикина К.Г., 2015).

Значительный индивидуальный размах наблюдали и при оценке светосуммы индуцированной ХЛ за 10 секунд при различных типах патозооспермии. Так, если при нормозооспермии максимальное значение Sm не превышали уровня 59,4 (отн.ед. ХЛ), то при патозооспермии у отдельных пациентов этот уровень был существенно увеличен при тератозооспермии до 87,5 (отн.ед. ХЛ); олигоастенозооспермии до 102,9; при олигозооспермии до 118,2; при астенозооспермии – 380,1 (отн. ед. ХЛ) (Савикина К.Г., 2015).

### Гормональный профиль эякулята у мужчин в норме и при патозооспермии.

В таблице 2 показаны результаты исследований уровня изучаемых гормонов в эякуляте бесплодных мужчин с разными видами патозооспермии.

Таблица 2

#### Уровень исследуемых гормонов в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

Гормоны		Диагноз	Нормозооспермия (контроль)	Олигозооспермия	Астенозооспермия	Олигоастенозооспермия	Тератозооспермия
TTST (нмоль/л)	Максимальное значение		23,19	33,4	72,9	46,7	94,6
	Минимальное значение		8,2	6,3	11,1	11,0	8,6
	M±m p Δ%		13,51±0,90	13,06±2,22 > 0,1	23,97±3,72 < 0,05 +77	18,21±1,72 < 0,05 +35	22,72±6,31 0,05 < p < 0,1 +68
E2 (пг/мл)	Максимальное значение		73,30	78,5	123,6	99,5	66,8
	Минимальное значение		39,6	30,1	32,6	43,9	33,4
	M±m p Δ%		54,07±2,06	55,71±4,86 > 0,1	74,79±4,47 < 0,001 +38	67,11±3,19 < 0,002 +24	50,59±2,69 > 0,1
TRH (пг/мл)	Максимальное значение		267,6	202,2	216,0	216,0	271,7
	Максимальное значение		70,7	52,6	51,3	33,7	54,0

	M±m p Δ%	148,62±13,31	99,52±14,22 < 0,05 -33	116,30±10,46 0,05< p<0,1 -22	115,42±10,19 < 0,05 -22	156,13±17,17 > 0,1
IGF1 (нг/мл)	Максимальное значение	20,2	15,9	27,2	18,4	27,6
	Максимальное значение	6,0	4,9	4,7	4,5	8,5
	M±m p Δ%	11,47±0,60	10,37±1,46 > 0,1	14,35±10,46 < 0,05 +25	9,77±0,70 0,05<p<0,1 -15	17,15±1,59 < 0,001 +50
IGFBP1 (нг/мл)	Максимальное значение	1,082	0,464	1,802	0,464	0,658
	Максимальное значение	0,081	0,016	0,058	0,016	0,035
	M±m p Δ%	0,397±0,081	0,177±0,022 0,05<p<0,1 -55	0,364±0,099 > 0,1	0,136±0,026 <0,002 -65	0,186±0,056 0,05< p<0,1 -53
AMH (пг/мл)	Максимальное значение	23,9	24,6	3,7	0,4	24,6
	Максимальное значение	13,4	0,0	0,0	0,0	0,9
	M±m p Δ%	18,6±1,64 >0,05	12,3±0,77 >0,05	1,8±0,36 >0,05	0,2±0,05 >0,05	12,8±1,44 >0,05
DHT (пг/мл)	Максимальное значение	19130	7089	4857	4375	10100
	Максимальное значение	4823	4463	4797	3240	9214
	M±m p Δ%	11977±678,1 >0,05	5776±439,5 >0,05	4827±390,5 >0,05	3808±540,2 >0,05	9657±864,5 >0,05

Примечание. p - достоверность различий относительно контроля. Δ% - изменение показателя в % по сравнению с контролем.

Как следует из таблицы, при астено-, олигоастено- и тератозооспермии наблюдается повышение на 77%, 35% и 68% уровня тестостерона в эякуляте относительно нормозооспермии. Учитывая сильную индивидуальную вариабельность уровня тестостерона при различных типах патоспермии, он может иметь диагностическую значимость при персонифицированном подходе к проблеме мужского бесплодия в сочетании с другими показателями, в том числе полиморфными вариантами генов. Минимальное среднее значение содержания TTST в сперме также получено в группе бесплодных мужчин с олигозооспермией.

Нами установлено, что уровень эстрадиола в эякуляте повышается на 38% и 24% при астенозооспермии и олигоастенозооспермии по сравнению с фертильными донорами, тогда как в группах с олигозооспермией и тератозооспермией содержание E2 находится в пределах контроля. В соответствии с критерием Манна-Уитни, у мужчин с олигоастенозооспермией и астенозооспермией установлено достоверное увеличение эстрадиола в спермоплазме в сравнении с контролем (Савикина К.Г., 2015).

Важную роль в ответ на окислительный стресс играет гипоталамо-гипофизарно-гонадная и тиреоидная ось эндокринной регуляции. В ходе исследования выявлено, что максимальное значение TRH зафиксировано в группе тератозооспермии, минимальное – в группе олигоастенозооспермии. Максимальное среднеарифметическое уровня TRH в спермоплазме также отмечено группе тератозооспермии. Минимально среднеарифметическое значение TRH находится в группе пациентов с олигозооспермией (Савикина К.Г., 2017). В соответствии с критерием Манна-Уитни, обнаружено статистически значимое снижение уровня TRH на 22-33% в эякуляте пациентов с олигозооспермией, астенозооспермией и олигоастенозооспермией по сравнению с контролем. У инфертильных мужчин с астенозооспермией и тератозооспермией наблюдается достоверное повышение уровня IGF1 в эякуляте относительно нормозооспермии, тогда как в группе с олигоастенозооспермией отмечена тенденция к снижению содержания IGF1 (Савикина К.Г., 2017). Также у пациентов с олигоастенозооспермией зарегистрировано достоверное снижение уровня IGFBP1 по сравнению с контрольной группой фертильных доноров спермы (Савикина К.Г., 2017).

Статистически достоверных различий в уровне АМН и ДНТ между группами пациентов с разными типами патозооспермии не обнаружено (Савикина К.Г., 2017)

При сравнении уровней исследуемых гормонов, у пациентов с патозооспермией обнаруживается положительная корреляция по целому ряду показателей. Уровень тестостерона достоверно изменяется в зависимости от возраста пациентов; уровень TRH положительно коррелирует с уровнем IGF1, а АМН с ДНТ. В свою очередь, IGF1 в группе пациентов с патозооспермией положительно коррелирует с уровнем IGFBP1 и ДНТ. У инфертильных мужчин с патозооспермией, так же, как и в группе фертильных доноров спермы, прослеживается положительная корреляция между уровнем тестостерона и эстрадиола (Савикина К.Г., 2017).

### **Роль полиморфных локусов генов *SOD1*, *PON1*, *NOS3*, *CAT* и *hOGG1* в развитии патозооспермии.**

Для полиморфных маркеров *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CAT C262T*, *NOS3 C786T* и *hOGG1 Ser326Cys* проводили генотипирование и статистический анализ. Результаты представлены в таблицах 3 – 5. Полученное распределение частот аллелей и генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга (HWE). Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. Для оценки ассоциаций мы рассчитали относительный риск ОШ с доверительным интервалом 95%. Наличие аллеля 326Cys аллелей гена *hOGG1* ассоциировано с олигозооспермией.

В таблицах 3-5 приведены результаты частот распространения полиморфных вариантов изучаемых генов и их ассоциаций с риском развития любого типа патозооспермии. По результатам анализа нами не выявлено статистически

значимых различий в частотах аллелей и генотипов в сравнении с контрольной группой.

Таблица 3.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CAT C262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с астенозооспермией (случай) и нормозооспермией (контроль).

Генотип/аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-39)	$\chi^2$	P	OR	(95% CI)
<b><i>PON1 Q192R</i></b>						
<i>QQ</i>	30 (60,0%)	27 (69,2%)	0,811	0,368	1,5	0,62-3,63
<i>QR</i>	18 (36,0%)	11 (28,2%)			0,7	0,28-1,73
<i>RR</i>	2 (4,0%)	1 (2,6%)			0,63	0,06-7,23
Allele <i>Q</i>	0,780	0,833	0,789	0,357	1,41	0,66-3,02
Allele <i>R</i>	0,220	0,167			0,71	0,33-1,52
<b><i>SOD1 G7958A</i></b>						
<i>GG</i>	35 (70,0%)	34 (88,0%)	3,712	0,055	2,91	0,95-8,9
<i>GA</i>	15 (30,0%)	4 (11,0%)			1,87	0,44-7,94
<i>AA</i>	0	1 (1,0%)			1,29	0,08-2,12
Allele <i>G</i>	0,850	0,923	2,249	0,134	2,12	0,78-5,74
Allele <i>A</i>	0,150	0,077			0,47	0,17-1,28
<b><i>CAT C262T</i></b>						
<i>CC</i>	30 (57,0%)	25 (65,2%)	0,156	0,693	1,19	0,5-2,83
<i>CT</i>	15 (37,0%)	13 (31,1%)			1,17	0,47-2,87
<i>TT</i>	5 (6,0%)	1 (3,7%)			0,24	0,03-2,12
Allele <i>C</i>	0,750	0,808	0,837	0,361	1,4	0,68-2,88
Allele <i>T</i>	0,250	0,192			0,71	0,35-1,47
<b><i>NOS3 C786T</i></b>						
<i>CC</i>	8 (16,0%)	4 (10,3%)	0,620	0,432	0,6	0,17-2,16
<i>CT</i>	23 (46,0%)	20 (51,3%)			1,24	0,53-2,86
<i>TT</i>	19 (38,0%)	15 (38,4)			1,02	0,43-2,41
Allele <i>C</i>	0,390	0,359	0,180	0,672	0,88	0,47-1,62
Allele <i>T</i>	0,610	0,641			1,14	0,62-2,11
<b><i>hOGG1 Ser326Cys</i></b>						
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0%)	30 (76,9%)	1,264	0,261	<b>3,67</b>	<b>1,3-10,35</b>
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0%)	8 (20,5%)			0,5	0,19-1,33
<i>Cys/Cys</i>	0	1 (2,6%)			1,29	0,08-2,12
Allele <i>Ser</i>	0,830	0,872	0,595	0,441	1,39	0,6-3,24
Allele <i>Cys</i>	0,170	0,128			0,72	0,31-1,67

n – число пациентов;  $\chi^2$  - частотное распределение хи-квадрат; p – p-значение;  
OR- отношение шансов; CI - доверительный интервал

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PONI Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CAT C262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с олигозооспермией (случай) и нормозооспермией (контроль).

Генотип/ аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-40)	$\chi^2$	P	OR	(95% CI)
<i>PONI Q192R</i>						
<i>QQ</i>	30 (60,0%)	16 (40,0%)			2,25	0,96-5,26
<i>QR</i>	18 (36,0%)	22 (55,0%)	3,557	0,06	2,17	0,93-5,08
<i>RR</i>	2 (4,0%)	2 (5,0%)			1,26	0,17-9,39
Allele <i>Q</i>	0,780	0,675	2,506	1,114	0,59	0,3-1,14
Allele <i>R</i>	0,220	0,325			1,71	0,88-3,32
<i>SOD1 G7958A/</i>						
<i>GG</i>	35 (70,0%)	29 (73,0%)			0,89	0,35-2,22
<i>GA</i>	15 (30,0%)	11 (27,0%)	0,068	0,795	1,13	0,45-2,84
<i>AA</i>	0	0				
Allele <i>G</i>	0,850	0,862	0,056	0,813	1,11	0,48-2,57
Allele <i>A</i>	0,150	0,138			0,9	0,37-1,53
<i>CAT C262T</i>						
<i>CC</i>	30 (57,0%)	26 (64,0%)			1,38	0,63-3,06
<i>CT</i>	15 (37,0%)	12 (32,0%)	0,649	0,421	1,0	0,4-2,48
<i>TT</i>	5 (6,0%)	2 (4,0%)			0,47	0,09-2,58
Allele <i>C</i>	0,750	0,800	0,632	0,427	1,33	0,66-2,71
Allele <i>T</i>	0,250	0,200			0,75	0,37-1,53
<i>NOS3 C786T</i>						
<i>CC</i>	8 (16,0%)	5 (12,5%)			1,33	0,4-4,44
<i>CT</i>	23 (46,0%)	20 (50,0%)	0,220	0,639	1,17	0,51-2,7
<i>TT</i>	19 (38,0%)	15 (37,5%)			0,98	0,42-2,31
Allele <i>C</i>	0,390	0,375	0,042	0,838	0,94	0,51-1,72
Allele <i>T</i>	0,610	0,625			1,07	0,58-1,95
<i>hOGG1 Ser326Cys</i>						
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0%)	20 (50,0%)			0,82	0,37-1,82
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0%)	15 (37,5%)	2,350	0,126	1,16	0,49-2,77
<i>Cys/Cys</i>	0	5 (12,5%)			5,44	0,61-4,84
Allele <i>Ser</i>	0,830	0,687	5,05	0,025	0,45	0,22-0,91
Allele <i>Cys</i>	0,170	0,313			2,22	1,1-4,49

n – число пациентов;  $\chi^2$  - частотное распределение хи-квадрат; p – p-значение;  
OR- отношение шансов; CI - доверительный интервал

Таблица 5

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CAT C262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с патозооспермией (случай) и нормозооспермией (контроль).

Генотип/ аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-79)	$\chi^2$	p	OR	(95% CL)
<b><i>PON1 Q192R</i></b>						
<i>QQ</i>	30 (60,0%)	43 (54,4%)			0,80	0,39-1,63
<i>QR</i>	18 (36,0%)	33 (41,7%)	0,387	0,535	1,28	0,61-2,65
<i>RR</i>	2 (4,0%)	3 (3,9%)			0,95	0,15-5,88
Allele <i>Q</i>	0,780	0,753	0,244	0,622	0,86	0,47-1,56
Allele <i>R</i>	0,220	0,247			1,16	0,64-2,11
<b><i>SOD1 G7958A</i></b>						
<i>GG</i>	35 (70,0%)	63 (79,8%)			1,69	0,75-3,82
<i>GA</i>	15 (30,0%)	15 (19,0%)	1,593	0,207	0,55	0,24-1,25
<i>AA</i>	0	1 (1,2%)			0,63	0,04-1,02
Allele <i>G</i>	0,850	0,892	1,014	0,315	1,46	0,73-1,08
Allele <i>A</i>	0,150	0,108			0,68	0,32-1,44
<b><i>CAT C262T</i></b>						
<i>CC</i>	30 (57,0%)	51 (64,6%)			1,21	0,59-2,52
<i>CT</i>	15 (37,0%)	25 (31,7%)	0,272	0,602	1,08	0,5-2,33
<i>TT</i>	5 (6,0%)	3 (3,9%)			0,62	0,12-3,19
Allele <i>C</i>	0,750	0,804	1,043	0,308	1,37	0,75-2,49
Allele <i>T</i>	0,250	0,196			0,73	0,4-1,33
<b><i>NOS3 C786T</i></b>						
<i>CC</i>	8 (16,0%)	9 (11,4%)			0,68	0,24-1,88
<i>CT</i>	23 (46,0%)	40 (50,7%)	0,568	0,451	1,2	0,59-2,45
<i>TT</i>	19 (38,0%)	30 (37,9%)			1	0,48-2,07
Allele <i>C</i>	0,390	0,367	0,137	0,712	0,91	0,54-1,52
Allele <i>T</i>	0,610	0,633			1,1	0,66-1,85
<b><i>hOGG1 Ser326Cys</i></b>						
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0%)	50 (63,3%)			0,89	0,42-1,87
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0%)	23 (29,2%)	0,098	0,755	0,80	0,37-1,71
<i>Cys/Cys</i>	0	6 (7,5%)			4,03	0,47-34,5
Allele <i>Ser</i>	0,830	0,778	1,010	0,315	0,72	0,38-1,37
Allele <i>Cys</i>	0,170	0,222			0,59	0,29-1,17

n – число пациентов;  $\chi^2$  - частотное распределение хи-квадрат; p – p-значение;  
OR- отношение шансов; CI - доверительный интервал

## Межгенные взаимодействия и вклад полиморфных локусов генов ферментов, принимающих участие в свободнорадикальных процессах при патозооспермии.

С помощью программы MDR нами построена оптимальная модель взаимодействий генов ферментов, участвующих в свободнорадикальных процессах (*SOD1*, *PON1*, *NOS3*, *CAT*) и гена фермента репарации ДНК (*hOGG1*) для мужчин с патозооспермией. Наша модель характеризуется 100%-ной воспроизводимостью (Cross Validation consistency) и 78%-ной точностью предсказания (testing balanced accuracy). Чувствительность модели (Se) составила – 0,7342, специфичность (Sp) – 0,8163.

Исходя из максимальных значений коэффициента перекрестной проверки и точности предсказания для данного анализа оптимальным межгенным взаимодействием является пятилокусная модель (*SOD1*, *CAT*, *PON*, *NOS3*, *hOGG1*), которая характеризуется коэффициентом перекрестной проверки 10/10 и точностью предсказания 78% ( $\chi^2=36,74$ ( $p<0,0001$ ), OR=12,27, 95% CI 5,09 – 29,55) На следующем этапе оценивалась информационная ценность каждого маркера. Взаимодействие пары генов оценили с помощью схемы Фрюхтерман-Рейнгольда (Рисунок 1).

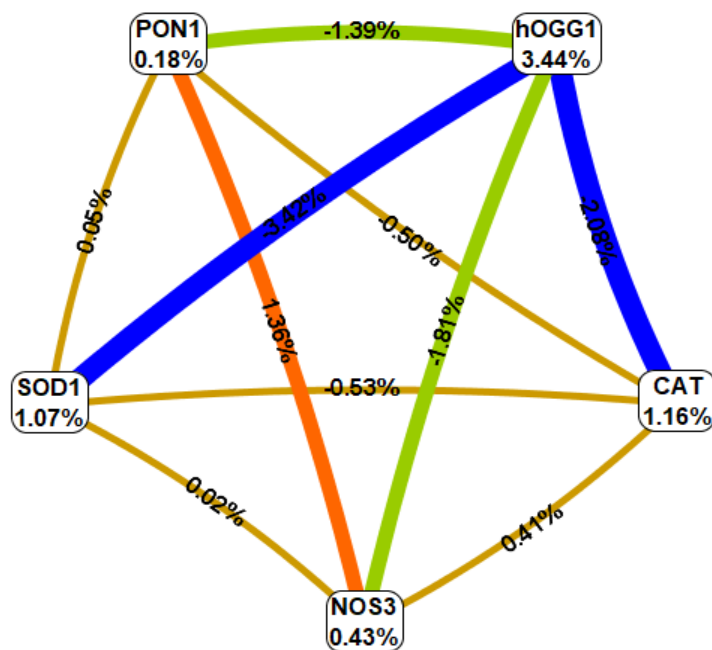


Рисунок 1. Схема Фрюхтерман-Рейнгольда межгенных взаимодействий *PON1* (*Q192R*), *SOD1* (*G7958A*), *CAT* (*C262T*), *NOS3* (*C786T*) и *hOGG1* (*Ser326Cys*) у мужчин с патозооспермией.

Примечание: характер взаимодействия между генами при формировании фенотипа характеризуется цветом линии: красный – выраженный синергизм, оранжевый – умеренный синергизм, синий и зеленый – антагонизм, коричневый – аддитивное взаимодействие. Сила и направленность взаимодействия выражены в % энтропии.

При анализе величины информации для каждого гена в отдельности было показано, что полиморфные варианты изученных генов влияют на фенотипическое проявление патозооспермии с разной силой. Согласно схеме Фрюхтерман-Рейнгольда, из пяти анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладают полиморфные варианты *hOGG1 Ser326Cys* (3,44%), *CAT C262T* (1,16%) и *SOD1 (G7958A)* (1,07%), тогда как наибольшим эффектом межгенного взаимодействия обладают локусы *PON1 (Q192R)* и *NOS3 (C786T)*. На долю данной комбинации приходится 1,36% фенотипической энтропии, что демонстрирует синергический эффект данных полиморфизмов при формировании патозооспермии у мужчин, проживающих в Ростовской области. Локусы *SOD1 G7958A* и *hOGG1 Ser326Cys*, *CAT C262T* и *hOGG1 Ser326Cys* показывают достаточно сильный антагонистический эффект (-3,42% и -2,08%, соответственно). Остальные локусы оказывают независимый эффект в формировании патозооспермии.

### Мультифакторный анализ изучения взаимосвязей между генотипом, окислительным стрессом и гормональный фон у пациентов с патозооспермией.

Гормональный фон и интенсивность свободно-радикальных процессов в семенной плазме у мужчин являются более значимыми факторами для оценки фертильности при нормозооспермии. При патозооспермии вклад окислительного статуса семенной плазмы (ХЛ) снижается (особенно при астенозооспермии он равен практически нулю) и более значимыми показателями являются гормональный фон и немного увеличивается вклад исследуемых полиморфных вариантов генов (Рисунок 2).

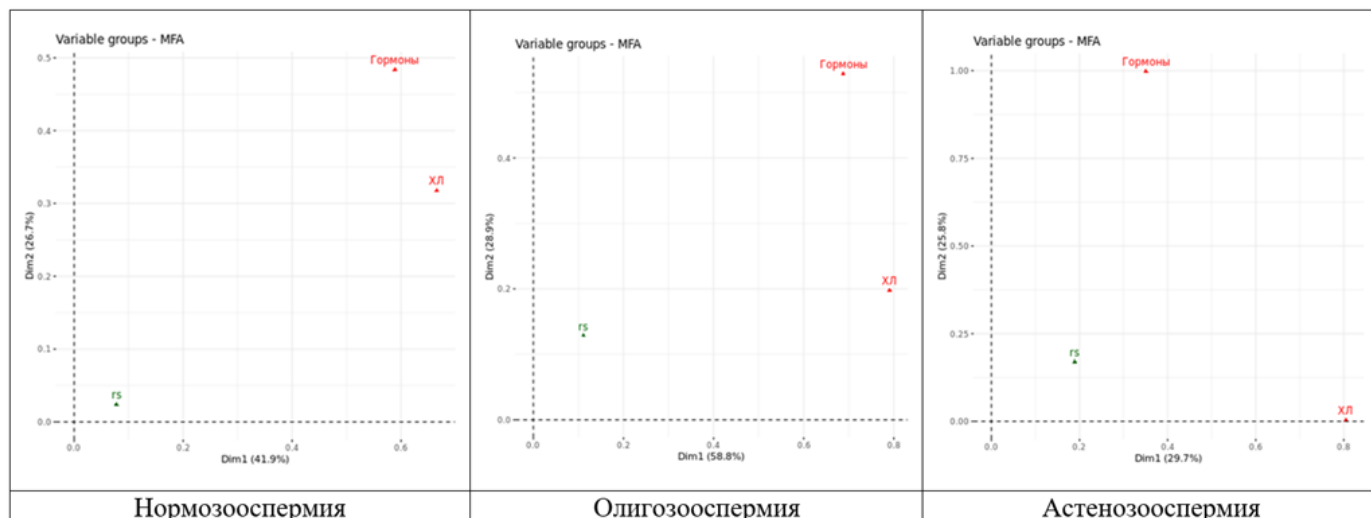


Рис. 2. Результаты мультифакторного анализа представления качества групп количественных переменных на карте факторов в норме и при астенозооспермии. Примечание: rs - все исследуемые полиморфные варианты генов. ХЛ - все исследуемые параметры интенсивности свободно-радикальных процессов; Гормоны – все изученные гормоны.



При олигозооспермии и астенозооспермии возрастает роль полиморфных вариантов генов, происходит снижение вклада оценки уровня интенсивности свободно-радикальных процессов, а уровень содержания гормонов остается главной компонентой в оценке нормо- и патозооспермии.

При олигозооспермии изменение интенсивности свободно-радикальных процессов (ХЛ) и емкости антиоксидантных систем ( $S_m$ ) меняет свою инерцию в отрицательную сторону. Как видно из представленных результатов направление показателей гормонального фона при нормо- и патоспермии имеют одинаковую инерцию. Однако, содержание IGF1 при олигозооспермии стремиться к 1 ( $\cos^2$ ), это значит, что данная переменная хорошо описывается двумя измерениями, и значение  $\cos^2$  близко к единице – таким образом содержание IGF1 в эякуляте мужчин большой вклад в значимый показатель для оценки олигозооспермии, при астенозооспермии большой вклад в группу «Гормоны» оказывает изменчивость тестостерона и белок-1, связывающий инсулиноподобного фактора роста. При олигозооспермии изменение интенсивности свободнорадикальных процессов (ХЛ) и емкости антиоксидантных систем ( $S_m$ ) меняет свою инерцию в отрицательную сторону.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенного нами исследования установлены изменения некоторых компонентов редокс-гомеостаза и гормонального профиля семенной плазмы в группе пациентов с инфертильностью по сравнению с фертильными мужчинами. При патозооспермии любого вида наблюдается сдвиг редокс-баланса в спермальной среде в сторону усиления окислительных процессов. Оценка редокс-состояния спермы посредством параметров ( $H$ ,  $S_m$ ) гидропероксид-индуцированной люминол-зависимой ХЛ (ГЛХЛ) свидетельствует о существенном повышении интенсивности свободно-радикальных процессов и снижении емкости антиоксидантной системы у инфертильных мужчин при патозооспермии. Причем, в эякуляте мужчин с олигоастенозооспермией и олигозооспермией высота быстрой вспышки ГЛХЛ в 1,8-2,1 раза превосходит, а в группе с астенозооспермией в 1,5 раза превышает данный показатель в группе с нормозооспермией на фоне повышения способности липидов спермоплазмы к окислению и снижению мощности антиоксидантной защиты. При тератозооспермии параметры ГЛХЛ имеют аналогичную, но менее выраженную направленность.

Образование АФК в ЭТЦ митохондрий обусловлено влиянием эстрогенов, в частности,  $17\beta$ -эстрадиола ( $E_2$ ). Согласно полученным нами результатам, при астенозооспермии и олигоастенозооспермии наблюдается достоверное повышение уровня  $E_2$  ( $p < 0,002 - 0,001$ ) в эякуляте по сравнению с нормозооспермией. Известно, что  $17\beta$ -эстрадиол проявляет двойственное действие на функции митохондрий (Nilsen J., 2008). С одной стороны,  $E_2$  стимулирует активность комплекса IV ЭТЦ, улучшая митохондриальное дыхание и образование АТФ. С другой стороны, под влиянием  $E_2$  увеличивается

скорость потока электронов по дыхательной цепи, что способствует сверхпродукции АФК.

Редокс-баланс в семенной жидкости и сперматозоидах поддерживается функционированием антиоксидантной системы (АОС). Сопряженное действие компонентов АОС спермы обеспечивает нормальную функциональную активность сперматозоидов и их способность к оплодотворению. Вместе с тем, общепризнано, что низкое качество спермы связано с дисбалансом и недостаточностью антиоксидантной защиты и развитием ОС (Aitken R.J., Roman S.D., 2008; Shamsi M.B. et al., 2009). В наших исследованиях показано снижение антиоксидантной емкости семенной плазмы при патозооспермии, что подтверждается значительным повышением светосуммы ГЛХЛ. Это может быть обусловлено дисбалансом и нарушением сопряженности действия АОС спермы.

Известно, что зрелые, способные к оплодотворению, сперматозоиды являются результатом сложного процесса сперматогенеза, который критически зависит от гормонального профиля. Анализ гормонального состояния семенной плазмы инфертильных мужчин свидетельствует о значительном нарушении гормонального баланса.

Как показали наши исследования, в семенной плазме при различных вариантах патозооспермии наблюдаются резкие колебания уровня тестостерона (ТТСТ), важнейшего гормона мужской репродуктивной системы, играющего ключевую роль в инициации и поддержании сперматогенеза. Полученные результаты свидетельствуют о заметном повышении уровня ТТСТ в эякуляте при всех видах патозооспермии, выраженным в наибольшей степени при астенозооспермии (прирост в 1,7 раза), олигоастенозооспермии (прирост в 1,3 раза), тератозооспермии (прирост в 1,5 раза).

Исходя из полученных нами результатов, уровень ДНТ имеет наметившуюся тенденцию к снижению при олиго-, астено- и олигоастенозооспермии, хотя достоверных различий относительно нормозооспермии не показано вследствие широкого диапазона колебаний концентрации гормона. Тенденция к снижению уровня ДНТ в спермальной плазме может снизить транскрипционную активность генов, содержащих в промоторах специфическую нуклеотидную последовательность ДНК - андроген-респонсивный элемент (AnRE), что может негативно отразиться на функции мужской репродуктивной системы.

При проведении сравнительного анализа гормонального статуса при мужской инфертильности нами установлен достоверно более высокий уровень эстрадиола в эякуляте пациентов с астенозооспермией и олигоастенозооспермией относительно фертильных мужчин. Установлено, что изменение уровня эстрадиола в тестикулах с высокой вероятностью приводит к нарушению сперматогенеза. В исследовании ряда авторов установлено, что повышение уровня эстрадиола в сыворотке периферической крови вызывает

развитие олигоастенозооспермии и нарушение морфологии сперматозоидов (Пичугова С.В. и др., 2016; Sevilla R.A. et al., 1991).

Гормональный дисбаланс в эякуляте инфертильных мужчин характеризуется также снижением уровня тиреоид-рилизинг-гормона (TRH) при олиго-, астено- и олигоастенозооспермии по сравнению с нормозооспермией (табл. 4.1), что указывает на нарушение гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси. Известно, что гипоталамический тиреотропин-рилизинг-гормон стимулирует секрецию тиреотропного гормона (ТТН) из передней доли гипофиза, который инициирует синтез и секрецию гормонов щитовидной железы. TRH имеет решающее значение для нормальной регуляции гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси. При низком уровне TRH гипофиз не вырабатывает достаточное количество ТТН, а последующее выделение гормонов щитовидной железы является недостаточным, приводя к гипотиреозу (Nikrodhanond A.A. et al., 2006).

Нарушение гормонального профиля эякулята у инфертильных мужчин связано с повышением уровня инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) при астенозооспермии и тератозооспермии по сравнению с фертильными донорами.

Известно, что IGF1 стимулирует созревание сперматозоидов, способствует увеличению их подвижности, а также положительно коррелирует с общим количеством мужских половых клеток (Moss J.L. et al., 2013). В соответствие с этим, полученные нами данные о повышении уровня IGF1 в эякуляте при астено- и тератозооспермии, по-видимому, можно рассматривать в качестве позитивных изменений. Однако, наметившаяся тенденция к снижению уровня IGF-связывающего белка 1 в эякуляте при патозооспермии может уменьшать биодоступность инсулиноподобного фактора роста 1 и нарушать эффективность его функционирования. Поскольку известно, что IGFBP1 может как стимулировать, так и подавлять эффекты IGF1 либо продлевая время полужизни фактора роста, либо конкурируя с рецепторами за его связывание. Активность самого IGFBP регулируется специфическим протеазами путем фрагментации белков, что уменьшает их сродство к IGF1 (Герштейн Е.С. и др., 2014).

Таким образом, нарушение редокс-гомеостаза и гормонального профиля эякулята относятся к характерным взаимосвязанным и взаимозависимым механизмам патогенеза патозооспермии. Сверхпродукция АФК в эякуляте при патозооспермии, показанная в нашей работе, может способствовать развитию мужской инфертильности не только напрямую, индуцируя окислительный стресс, но и опосредованно, действуя через гипоталамо-гипофизарно-гонадную и другие гипоталамические гормональные оси, нарушая гормональный баланс и вызывая развитие бесплодия.

В нашем исследовании показано, что гены ферментов антиоксидантной системы и репарации ДНК вносят определенный вклад в формирование патозооспермии. Нами установлено, что полиморфным локусом-маркером повышенного риска развития олигозооспермии в изученной популяции

инфертильных мужчин Ростовской области является *hOGG1 Ser326Cys*. Данный полиморфный вариант гена *hOGG1* ассоциирован с пониженной активностью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы 1 и накоплением маркера окислительного стресса - 8-оксогуанина - в различных клетках, в том числе, в сперматозоидах, что приводит к замене G/C → T/A и нарушает стабильность и целостность генома.

Методом редукции многофакторной размерности (MDR) нами установлено, что наибольшей достоверностью и воспроизводимостью среди возможных MDR-мультилокусных моделей для определения риска развития мужской инфертильности в исследованной популяции обладает пятилокусная модель *SOD1G7958A x CAT C262T x PON1 Arg192Glu x NOS3C786T x hOGG1 Ser326Cys*. Данная модель включает важнейший комплекс полиморфных вариантов генов антиоксидантных ферментов, гена эндотелиальной NO-синтазы, регулирующей сигнальный путь NO/cGMP/PKG, и ген фермента эксцизионной репарации ДНК, которые могут вносить критический вклад в развитие окислительно-нитрозильного стресса и окислительное повреждение ДНК при мужской инфертильности. Кроме того, в проведенном исследовании установлено, что риск развития любого типа патозооспермии повышается при сочетании полиморфных вариантов *NOS3 C786TxPON1 Arg192Glu*.

Таким образом, анализ межгенного взаимодействия показал роль сочетаний определенных полиморфных вариантов для проявления их патогенетических свойств. Показано характерное для бесплодных мужчин Ростовской области сочетание аллелей генов, регулирующих развитие окислительного стресса и репарацию ДНК. Изученные генетические характеристики расширяют знания о механизмах наследственной предрасположенности к развитию патозооспермии. Полученные данные следует применять при разработке новых методов диагностики патозооспермии и лечении мужского бесплодия.

## ВЫВОДЫ

1. При патозооспермии в эякуляте инфертильных пациентов значительно возрастает высота быстрой вспышки и светосумма гидропероксид-индуцированной люминол-зависимой ХЛ с наибольшим отличием от нормы при олиго- и олигоастенозооспермии, что указывает на повышение интенсивности свободно-радикальных процессов и снижение емкости антиоксидантной системы спермы.

2. При патозооспермии наблюдается существенный дисбаланс гормонального профиля эякулята инфертильных мужчин. При снижении подвижности сперматозоидов повышается уровень тестостерона, эстрадиола, инсулиноподобного фактора роста<sup>1</sup>, но снижается содержание тиреотропин-рилизинг-гормона. При уменьшении количества сперматозоидов происходит снижение уровня тиреотропин-рилизинг-гормона и отмечена тенденция к снижению содержания ДНТ, IGF1, IGF1BP1 и АМН. При нарушении морфологии сперматозоидов отмечено повышение уровня тестостерона и IGF1 на фоне тенденции к снижению содержания ДНТ, IGF1BP1 и АМН. Обнаружены корреляционные зависимости в изменении гормонального профиля при нормозооспермии и патозооспермии.

3. Риск развития олигозооспермии повышается при наличии в генотипе полиморфного варианта *hOGG1 Ser326Cys* (rs1052133).

4. Риск развития любого типа патозооспермии повышается при сочетании полиморфных вариантов *NOS3C786TxPON1Arg192Glu* и увеличении интенсивности хемилюминесценции.

5. При олигозооспермии и астенозооспермии возрастает роль полиморфных вариантов генов, происходит снижение вклада оценки уровня интенсивности свободно-радикальных процессов, а уровень содержания гормонов остается главной компонентой в оценке нормо – и патозооспермии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Мужчинам из пар с бесплодием рекомендуется оценивать уровень окислительного стресса в эякуляте.
2. Гидропероксид-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция является высоко чувствительным и информативным методом определения интенсивности окислительного стресса и рекомендуется при диагностике мужской инфертильности с целью определения терапевтических стратегий.
3. Определение интенсивности свободно-радикальных процессов в сперме необходимо проводить при вступлении пациентов в программы ВРТ, исходя из способности АФК повреждать ДНК сперматозоидов и инициировать их апоптоз, что впоследствии приводит к нарушению эмбрионального развития и генетическим аномалиям плода.

4. Мужчинам, имеющим патозооспермию по результатам спермограммы, рекомендуется проводить генетический анализ для выявления полиморфного варианта *hOGG1 Ser326Cys*.
5. Полученные данные о частоте аллельных вариантов генов антиоксидантных ферментов рекомендуется использовать при оценке риска развития мужской инфертильности в медико-генетических консультациях.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи, опубликованные в журналах, входящих в базу данных международных индексов научного цитирования Scopus**

1. Association of CAT C262T (rs1001179) polymorphism with male infertility: Meta-analysis / K. G. Savikina, A. H. Abd Ali, T. P. Shkurat, S. V. Lomteva, G. V. Karantysh // *Meta Gene*. – 2021. – Т. 30. – Art. No. 100974. – DOI 10.1016/j.mgene.2021.100974

### **Статьи, опубликованные в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных ВАК**

2. Межгенные взаимодействия и вклад полиморфных локусов генов ферментов, принимающих участие в свободнорадикальных процессах при патозооспермии / Савикина К. Г., Машкина Е. В., Александрова А. А., Шкурят Т. П., Ломтева С. В. // *Медицинская генетика*. – 2021. – Т. 20. – №11 (232). – С. 36-44.

3. Ассоциация гена FSHR с сывороточным уровнем гормонов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и овариальным ответом / Лянгасова О. В., Ломтева С. В., Савикина К. Г., Александрова А. А., Бугримова Е. С., Шкурят Т. П. // *Медицинская генетика*. – 2021. – Т. 20. – №12 (233). – С. 23-33.

### **Статьи и тезисы, опубликованные в других изданиях**

4. The Intensity of Free Radical Processes and the Testosterone and Estradiol Levels in Seminal Fluid of Men with Different Types of Pathospermia - Personalized Approach / Shkurat T, Savikina K, Lomteva S, Sagamonova K, Shestel A, Prokofev V, Sherchkova T, Shimanskaya E, Derevyanchuk E, Aleksandrova A. // *Online Journal of Health and Allied Sciences*. – 2016. – Vol. 15. – №1. – Art. No. 5. – Режим доступа: <http://www.ojhas.org/issue57/2016-1-5.html> (дата обращения 15.04.2022).

5. Полиморфные варианты гена FSHR и гормональный профиль при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий / О. В. Лянгасова, К. Г. Савикина, С. В. Ломтева, Т. П. Шкурят // *Живые и биокосные системы*. – 2017. – №. 19. – С. 6-6. <http://www.jbks.ru/archive/issue-19/article-6>

6. Окислительный стресс и мужская репродуктивная система / Ломтева С. В., Савикина К. Г., Шестель А. Н., Сагамонова К. Ю., Шкурят Т. П. // *Валеология*. – 2015. – Т. 1. – С. 59-67.

7. Интенсивность свободно-радикальных процессов и уровень тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости мужчин с различными типами

патоспермии, персонифицированный подход / К. Г. Савикина, С. В. Ломтева, А. Н. Шестель, К. Ю. Сагамонова, В. Н. Прокофьев, Т. А. Шерчкова, А. А. Александрова, М. А. Амелина, Т. П. Шкурят // Валеология. – 2015. – №. 3. – С. 15-21.

8. Содержание тиреотропин-рилизинг-фактора и инсулинподобного фактора роста-1 в семенной жидкости при различных типах патоспермии / Т. П. Шкурят, К. Ю. Сагамонова, К. Г. Савикина, С. В. Ломтева, Л. В. Гутникова, О. В. Лянгасова, А. А. Александрова // Валеология. – 2017. – №. 1. – С. 12-17.

9. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера Ser326Cys гена hOGG1 при патозооспермии / С. В. Ломтева, К. Ю. Сагамонова, Т. П. Шкурят, К. Г. Савикина, О. В. Лянгасова, М. В. Левченко, А. Н. Шестель, М. А. Максимова, Г. А. Чурюмова, А. С. Зейнулабидова // Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: материалы VIII научно-практической конференции с международным участием, Ростов-на-Дону, 26-29 сентября 2019 г. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 41-42.

10. Ломтева, С. В. Интенсивность индуцированной хемилюминесценции и уровень тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости мужчин с различными типами патоспермии / С.В. Ломтева, К.Ю. Сагамонова, К.Г. Савикина, Т.А. Шерчкова, В.Н. Прокофьев, Т.П. Шкурят // Репродуктивные технологии сегодня и завтра : материалы XXV Юбилейной международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека, (9-12 сентября 2015 г., Сочи). – Сочи, 2015. – С. 123-125. – Режим доступа: [https://www.rahr.ru/d\\_pech\\_mat\\_konf/Tezis\\_2015.pdf](https://www.rahr.ru/d_pech_mat_konf/Tezis_2015.pdf) (дата обращения 15.04.2022).

11. Ассоциации полиморфизма гена PON1 GLN192AGR с различными типами патоспермии / Ломтева С. В., Савикина К. Г., Машкина Е. В., Шерчкова Т. А., Шкурят Т. П. // Мать и дитя - 2016: материалы XVII Всероссийского научно-образовательного форума, Москва, 27-30 сентября 2016 г. – Москва: МЕДИ Экспо, 2016. – С. 249-250.– Режим доступа: [https://www.mediexpo.ru/fileadmin/user\\_upload/content/pdf/thesis/thesis\\_md16.pdf](https://www.mediexpo.ru/fileadmin/user_upload/content/pdf/thesis/thesis_md16.pdf) (дата обращения 15.04.2022).

12. Анализ ассоциаций полиморфизма G7958A гена CUZN-SOD с различными типами патоспермии /- Александрова А. А., Неведомская А. О., Савинкина К. Г., Амелина М. А., Ломтева С. В., Сагамонова К. Ю. // Мать и дитя - 2016: материалы XVII Всероссийского научно-образовательного форума, Москва, 27-30 сентября 2016 г. – Москва: МЕДИ Экспо, 2016. – С.245-246. – Режим доступа: [https://www.mediexpo.ru/fileadmin/user\\_upload/content/pdf/thesis/thesis\\_md16.pdf](https://www.mediexpo.ru/fileadmin/user_upload/content/pdf/thesis/thesis_md16.pdf) (дата обращения 15.04.2022).

13. Анализ взаимодействия генов окислительного стресса при патоспермии / С. В. Ломтева, К. Г. Савикина, А. Н. Шестель, Р. М. Арутюнян, Е. В. Машкина / Сборник тезисов XXVII Ежегодной Международной конференции РАРЧ

"Репродуктивные технологии сегодня и завтра" и Симпозиума РАРЧ/IFFS, 6-9 сентября 2017, Санкт-Петербург. – 2017.– С. 260. – Режим доступа: [https://www.rahr.ru/d\\_pech\\_mat\\_konf/Abstracts\\_RAHR%20IFFS%202017.pdf](https://www.rahr.ru/d_pech_mat_konf/Abstracts_RAHR%20IFFS%202017.pdf) (дата обращения 15.04.2022).

14. The hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Pathospermia / Shkurat T., Savikina K., Lomteva S., Aleksandrova A., Shkurat M. //Annals Academy of Medicine, Singapore. 7 th Singapore Health & Biomedical Congress. – 2016. – Vol. 45 (Suppl.). – No 9. – P. 162. – Режим доступа: <https://annals.edu.sg/pdf/45VolNo9Sep2016/SHBC2016.pdf> (дата обращения 15.04.2022).

15. Oxidative Status Markers in the Diagnosis of Pathospermia / Shkurat T., Sherchkova T., Alexandrova A., Savikina K., Nevedomskaya A., Gutnikova L., Lomteva S., Mashkina E // Annals Academy of Medicine, Singapore. 7 th Singapore Health & Biomedical Congress. – 2016. – Vol. 45 (Suppl.). – No 9. – P. 168. – Режим доступа: <https://annals.edu.sg/pdf/45VolNo9Sep2016/SHBC2016.pdf> (дата обращения 15.04.2022).

16. ДНК-фрагментация у мужчин с патоспермией / Е.С. Бугримова., Ломтева С.В., Савикина К.Г., Шестель А.Н., Зейнулабидова А.С., Максимова М.А., Крутящая И.Б., Чурюмова Г.А., Чегодарь А.С., Сагамонова К.Ю. // Сборник тезисов XXIX Ежегодной Международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра", 04–07 сентября 2019, Ростов-на-Дону – 2019 – С. 123-124 – Режим доступа: [https://www.rahr.ru/d\\_pech\\_mat\\_konf/Tezis\\_RAHR\\_2019.pdf](https://www.rahr.ru/d_pech_mat_konf/Tezis_RAHR_2019.pdf) (дата обращения 15.04.2022).