

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону - 2022

СОДЕРЖАНИЕ	СТР
Список сокращений	3
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Механизмы генетической регуляции сперматогенеза и влияние на него окислительного стресса	10
1.2. Гормоны семенной плазмы: биология и роль в патозооспермии	13
1.3. Активные формы кислорода и мужские половые гормоны	21
1.4. Полиморфизмы генов антиоксидантных ферментов и их вклад в мужское бесплодие	24
1.5. Окислительный стресс и повреждение ДНК сперматозоидов	29
Глава 2. Материалы и методы исследования	33
2.1. Дизайн исследования	33
2.2. Методы исследования	34
2.2.1. Семиологический анализ (спермограмма)	36
2.2.2. Хемилюминесцентный анализ в системе H ₂ O ₂ -люминол	37
2.2.3. Метод иммуноферментного анализа	38
2.2.4. Анализ исследуемых полиморфных вариантов	42
2.2.5. Сравнение выборок по частотам аллелей и генотипов	42
2.2.6. Методы статистического анализа	43
2.3. Контроль качества проводимых исследований	43
Глава 3. Результаты собственных исследований	44
3.1. Интенсивность свободно-радикальных процессов в эякуляте мужчин с различными видами патозооспермии	44
3.2. Гормональный профиль спермы у мужчин в норме и при патозооспермии	47
3.3 Роль полиморфных локусов генов <i>PON1</i> , <i>NOS3</i> , <i>SOD1</i> , <i>CAT</i> и <i>hOGG1</i> в развитии патозооспермии	55
3.4. Межгенные взаимодействия и вклад полиморфных локусов генов ферментов, принимающих участие в свободно – радикальных процессах при патозооспермии	63
3.5. Мультифакторный анализ взаимосвязей между генотипом, окислительным стрессом и гормональным фоном у пациентов с патозооспермией	67
Глава 4. Заключение	74
Выводы	77
Практические рекомендации	79
Список литературы	80

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 8-OHdG – 8-оксо-2'- дезоксигуанозин
AMH–антимюллеров гормон
APE1 – апириимидиновая эндонуклеаза 1
AR – андрогеновый рецептор
BER – эксцизионная репарация оснований
CAT - каталаза
DHT - дигидротестостерон
hOGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1
IGF1 – инсулиноподобный фактор роста 1
IGFB1 – белок 1, связывающий инсулиноподобный фактор роста
NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота
PON - параоксоназа
SOD - супероксиддисмутаза
TRH–тиреотропин-рилизинг-гормон
TTST - тестостерон
АКМ - активированные кислородные метаболиты
АОА – антиоксидантная активность
АФК – активные формы кислорода
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
ГЛХЛ - гидропероксид-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция
ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
ЛГ – лютеинизирующий гормон
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ОС – окислительный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ХЛ - хемилюминесценция
ФСВОК – федеральная система внешней оценки качества

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

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 *NOS3T786TxPON1Arg192Glu* 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 роста1, 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 *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).

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Механизмы генетической регуляции сперматогенеза и влияние на него окислительного стресса.

Окислительный стресс (ОС) является результатом нарушения баланса между образованием активных форм кислорода (АФК) и неспособностью доступных антиоксидантов нейтрализовать их чрезмерное производство. ОС приводит к перекисному окислению липидов, окислительной модификации белков, повреждению ДНК и гибели сперматозоидов (Agarwal A. et al., 2020; Гамидов С.И. и др., 2021; Коршунов М.Н. и др., 2021). ОС - одна из самых распространенных этиологий мужской инфертильности (Aitken R. J. et al., 2014, 2017). В случае идиопатического мужского бесплодия ОС принято считать одной из главных причин мужской дисфункции (Kumar N., Singh A.K., 2018; Varati et al., 2020). ОС оказывает влияние и на системном уровне, например, уменьшая количество тестостерона или лютеинизирующего гормона (Darbandi M. et al., 2018). Окислительный стресс также непосредственно повреждает ДНК сперматозоидов, тем самым ставя под угрозу отцовский геномный вклад в эмбрион (Wiweko B., Utami P., 2017). Поэтому ОС при мужском бесплодии может привести к серьезным рискам для здоровья, если не будет контролироваться во временном интервале.

Аэробы приспособились в ходе эволюции к существованию в среде с 21-процентным содержанием кислорода. Молекулярный кислород не обладает мутагенной активностью (Лысенко В.И., 2020; Aitken R.J., 2017; Chesa J., Aran J. M., 2020), в то время как АФК индуцируют мутации в клетках сперматогенеза (Николаев А. А. и др., 2018; Kumar N., Singh A. K., 2018).

Мужской половой системе и влиянию на нее окислительного стресса, АФК и антиоксидантов в последние годы посвящено большое количество исследований. Физиологические количества АФК необходимы для нормального функционирования сперматозоидов, гиперактивации и акросомальной реакции

(Aitken R.J., 2020; Dutta S. et al., 2020; R. Dias T. et al., 2020). Увеличение интенсивности ОС рассматривается многими исследователями как ведущая экзогенная причина нарушения сперматогенеза (Божедомов и др., 2020).

В образцах спермы 40% бесплодных мужчин обнаружены высокие концентрации АФК (Saleh R. et al., 2020). Было показано, что в регуляции физиологических функций семенника свободные радикалы и перекисное окисление липидов играют важную роль. Однако, как показывают исследования последних лет, основной причиной тестикулярной дисфункции различной этиологии является окислительный стресс (Aitken R.J., 2008; El-Shahat et al., 2009; Sharma P. et al., 2019; Baskaran S. et al., 2021). АФК оказывают влияние на процессы деления и дифференцировки клеток сперматогенеза, вызывают их апоптоз, и способны нарушать стероидогенез в клетках Лейдига (Dutta S. et al., 2020).

К высоким уровням АФК в организме могут привести возрастные изменения, образ жизни, воспаление, варикоцеле, диабет и ряд других причин (Magdi Y. et al., 2017; Benatta M. et al., 2020; Leisegang K., Dutta S., 2021; Кириленко Е. А., Оношко В. Ф., 2017; Каранинский Е. В. и др. 2020). Но роль каждого из них в развитии окислительного стресса сперматозоидов нуждается в уточнении.

Оценка уровня АФК важна для диагностики бесплодия, т.к. является гораздо более сильным его предиктором, чем обычная спермограмма. АФК являются основным этиологическим фактором повреждения ДНК (Aitken R. J., Drevet J. R., 2020). Широкий спектр повреждений приводит к значительному снижению рождаемости (Dorostghoal M. et al., 2017; Homa S. T. et al., 2019; Elbardisi H. et al., 2020; Fatima S. et al., 2020). Значительное число мужчин с нормальными показателями спермы – бесплодны и имеют высокий уровень АФК в сперме в сравнении с доказано фертильными мужчинами (Saleh R. et al., 2020). Измерение уровня АФК является значительным преимуществом в диагностике мужской

инфертильности, т.к. это обеспечивает большее понимание причин бесплодия (Agarwal A., Sengupta P., 2020).

Анализ уровня АФК в сперме очень важен, т.к. во многих случаях факторы, способствующие повышению АФК, могут быть обратимы с изменением образа жизни (Magdi Y. et al., 2017; Benatta M. et al., 2020; Leisegang K., Dutta S., 2021) и лечением антиоксидантами (Showell M. G. et al., 2014; Siva Kumar T., Neeraja P., 2019; Barati E., Nikzad H., Karimian M., 2020). Это позволит значительно снизить уровень АФК и повреждение ДНК, восстановить фертильность и улучшить показатели беременности.

В организме человека главными компонентами антиоксидантной системы являются ферменты каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD), синтаза оксида азота (NOS) и параоксоназа (PON). Эти ферменты поддерживают баланс окислительных процессов (Колесникова Л. и др., 2013; Scarlata E., O'Flaherty C., 2020; Baskaran S. et al., 2021).

8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (hOGG1) входит в состав системы репарации ДНК и является важным компенсаторным механизмом в ликвидации окислительных повреждений ДНК (Migliani K. et al., 2021). Поэтому мы провели поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов SOD1, CAT, PON1, NOS3, hOGG1 с риском возникновения патологических состояний в процессе сперматогенеза.

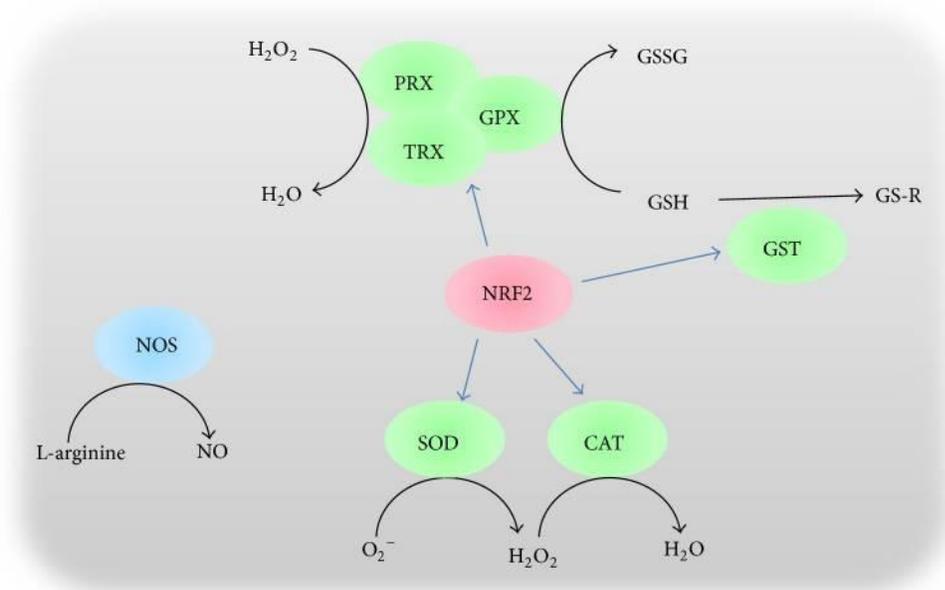


Рис.1.1. Основные антиоксидантные ферменты и их взаимодействие.

NRF2 регулирует экспрессию многих антиоксидантных ферментов, включая пероксиредоксин (PRX), тиоредоксин (TRX), глутатионпероксидазу (GPX), глутатион-S-трансферазу (GST), супероксиддисмутазы (SOD) и каталазу (CAT). Основной формой АФК является супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), который может превращаться в пероксид водорода (H_2O_2) с помощью SOD. H_2O_2 может восстанавливаться до H_2O с помощью CAT, TRX или PRX. GST катализирует конъюгирование восстановленного глутатиона (GSH) с ксенобиотическими субстратами. Синтазы оксида азота (NOS) катализируют образование оксида азота (NO) из L-аргинина. GS-R, GSH-ксенобиотические аддукты; GSSG, окисленный глутатион.

1.2. Гормоны семенной плазмы: биология и роль в развитии патозооспермии.

В гормональном контроле дифференцировки мужских половых клеток ключевую роль играет гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная ось (рис 1.2.1). Гормоны - лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон

(ФСГ), секретируется передней долей гипофиза. Мишенями для ЛГ и ФСГ являются клетки Сертоли и клетки Лейдига. Гипоталамус – главный центр регуляции функционирования мужской репродуктивной системы. Получая информацию от центральной нервной системы и тестикул, гипоталамус регулирует образование и секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона в пульсирующем режиме, что является необходимым звеном стимуляции синтеза и секреции лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона. ЛГ и ФСГ образуются также в тестикулах. Тестостерон, продукт внутренней секреции тестикул (клетками Лейдига), является главным ингибитором секреции ЛГ гипофиза у мужчин.

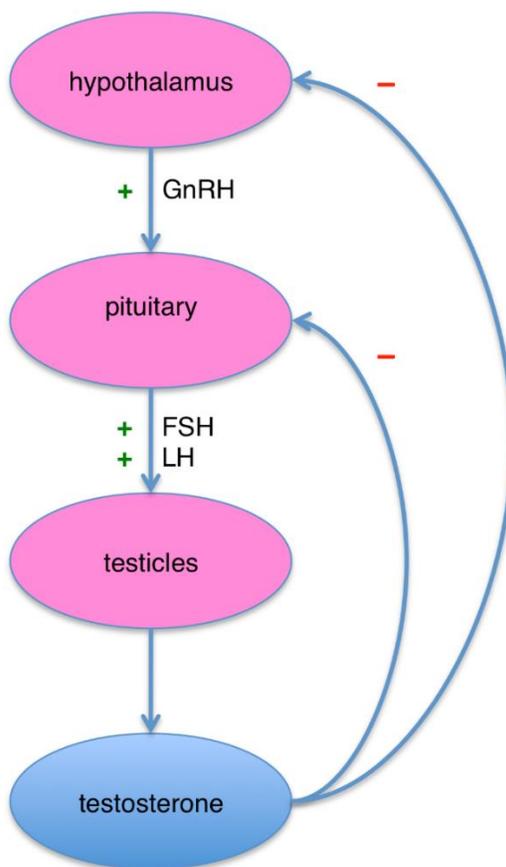


Рис. 1.2.1. Гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная ось.

Тестостерон обеспечивает дифференцировку сперматогониев и сперматоцитов, а также спермиогенез. Последовательная трансформация

холестерина в тестостерон происходит под влиянием пяти различных ферментных систем и нарушения на любом этапе приводят к андрогенной недостаточности, половой дисфункции и бесплодию (Huynh T., 2002; Федорова И. Д., Кузнецова Т. В., 2007).

Семенная плазма представляет собой уникальную среду для созревания, питания и защиты мужских половых клеток от повреждающих агентов. Она содержит множество органических и неорганических химических веществ, ряд биологически и иммунологически активных соединений, включая гормоны. Концентрации гормонов в семенной плазме значительно отличаются от уровня в плазме крови в зависимости от их происхождения. В некоторых случаях их информативность выше в эякуляте, чем определение в крови (Vitku J., Kolatorova L., Hampl R., 2017; Kumar N., Singh N. K., 2020).

Для поддержания сперматогенеза, и в целом, мужской фертильности необходим тестостерон. Без стимуляции тестостероном, сперматогенез не выходит за рамки мейоза: зародышевые клетки отрываются от клеток Сертоли и погибают. А зрелые сперматозоиды не высвобождаются из клеток Сертоли, что приводит к бесплодию. При его отсутствии нарушается образование гемато-тестикулярного барьера. Тестостерон поддерживает сперматогенез на различных уровнях и нарушение любого зависимого от тестостерона этапов приводит к мужскому бесплодию (Vitku et al., 2017; Fusco F. et al., 2020).

Тестостерон вырабатывают клетки Лейдига, находящиеся между семенными канальцами. Поскольку этот гормон вырабатывается локально, уровень его в 12-25 раз выше в яичке по сравнению с кровью. Часть тестостерона биодоступна: он свободен или связан с альбумином. Остальной тестостерон яичка связан с белком, связывающим стероидные гормоны или с белком, связывающим андрогены. Сперматогенез при низких уровнях тестостерона не происходит. (Zirkin B. R., Papadopoulos V., 2018).

Снижение уровня тестостерона в тестикулах после гипофизэктомии, иммунонейтрализации ЛГ, введение антиандрогенов или разрушение клеток Лейдига приводит к отрыву развивающихся сперматид от клеток Сертоли и прекращению сперматогенеза (Bhalla N., 2020; Cao M. et al., 2020). В тестикулах AR экспрессируется в перитубулярных миоидных клетках, которые окружают семенные каналцы, и в клетках Лейдига между семенными каналцами. В семенных каналцах только клетки Сертоли имеют рецепторы для тестостерона. Зародышевые клетки не экспрессируют AR. Следовательно, именно клетки Сертоли преобразовывают сигналы тестостерона, необходимые для развития клеток сперматогенеза. Тестостерон диффундирует через плазматическую мембрану и связывается с AR. Затем AR транслоцируется в ядро, где связывается со специфическими последовательностями ДНК, называемыми андрогенными элементами ответа, что приводит к привлечению ко-активаторов и регуляции экспрессии генов (Larose H. et al., 2020).

Давно известно, что тестостерон является доминирующим половым гормоном у мужчин. Однако, эстрогены обнаруживаются на разных уровнях сперматогенеза. В мужском организме эстрадиол необходим для реализации либидо, эректильной функции и сперматогенеза. Рецепторы эстрадиола, а также ароматазы, фермента, который превращает тестостерон в эстроген, в избытке присутствуют в мозге, пенисе и тестикулах. Кроме того, ненормальное соотношение TS/E (<10) связывают со снижением параметров спермы, а введение ингибитора ароматазы, нормализует это соотношение и улучшает концентрацию и подвижность сперматозоидов (Schlegel P.N., 2012; Sheikh A., 2021). Ориентация на уровни эстрогена имеет клиническое значение при оптимизации показателей извлечения сперматозоидов у мужчин с необструктивной азооспермией. Показатели извлечения сперматозоидов увеличивались в 1,4 раза за счет прямого или косвенного снижения уровня эстрадиола. (Fietz D. et al., 2020).

У различных видов животных, в том числе и у людей, в мужском репродуктивном тракте и сперме наблюдается более высокая концентрация эстрадиола, чем в сыворотке (Cooke P. S. et al., 2017). Синтез эстрадиола зародышевыми клетками внутри семенных канальцев вносит значительный вклад в гормональную среду внутри семенных канальцев. Ароматаза присутствует в основном в зрелых клетках Лейдига, продуцируя значительное количество эстрадиола в тестикулах (Leavy M. et al., 2017; Berger T. et al., 2021).

В то время как основным источником эстрадиола во взрослых тестикулах являются клетки Лейдига, клетки Сертоли производят большую часть эстрогена в незрелых тестикулах (Guercio G. et al., 2020). У нескольких видов животных мРНК ароматазы была обнаружена в клетках Сертоли на каждой стадии развития сперматозоидов (Berger T. et al., 2021). У крыс, подвергшихся воздействию эстрадиола, наблюдалось последующее дозозависимое снижение веса яичек на 20-70%. Снижение подвижности сперматозоидов также зависело от дозы эстрадиола. Его сильное увеличение вызывало азооспермию (Kotwicka M. et al., 2016).

Таким образом, эстрадиол оказался мощным гормоном, необходимым для выживания половых клеток. Однако, его избыток действует как ингибитор сперматогенеза у человека, вызывая его торможение через клетки Сертоли (López-Torres A. S., Chirinos M., 2017).

Антимюллеров гормон (АМН) – димерный гликопротеин, относится к семейству β -трансформирующих факторов роста. Секретируется фетальными клетками Сертоли и играет центральную роль в регрессии Мюллеровых протоков во время формирования мужского пола у плода (Shrikhande L., Shrikhande B., Shrikhande A., 2020). Самые высокие уровни АМН в сыворотке крови наблюдаются у мальчиков в возрасте 3-12 месяцев, и снижаются после наступления половой зрелости. До полового созревания производство АМН стимулируется дигидротестостероном (Arato I. et al., 2020). Тесная связь между

АМН и тестостероном наблюдается у взрослых мужчин с врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом (da Rosa L. A. et al., 2020). У этих мужчин отсутствует тестостерон в тестикулах, а концентрации АМН в сыворотке крови близки к пубертатным уровням. После полового созревания АМН преимущественно секретируется в просвет семенных канальцев и ограничен кровеносным барьером в тестикулах. Концентрация гормона, выявленная в семенной плазме, оказалась выше, чем в сыворотке крови (Xu H. et al., 2021).

Тем не менее, АМН в сыворотке или семенной плазме не используется для клинических исследований у взрослых мужчин. Так как АМН является специфичным для яичка гормоном, который вырабатывается также в зрелых клетках Сертоли, он может являться маркером качества спермы. Есть лишь небольшое количество доказательств о роли АМН в сперматогенезе. Более низкие уровни АМН в сыворотке крови были зарегистрированы у субфертильных мужчин по сравнению с фертильными мужчинами (Liu J. et al., 2017; Abdulkareem D. T., Alajeely M. H. J., Mohammad E. J., 2020), но такая связь обнаруживается не всегда (Aksglaede L. et al., 2018). Исследования показали положительную ассоциацию между уровнями АМН в семенной плазме и концентрацией сперматозоидов (Andersen J. M. et al., 2016; Peng L. P. et al., 2017), но эта ассоциация не наблюдалась в других исследованиях (Aksglaede L. et al., 2018). Противоречивые результаты также обнаружены в отношении связи между количеством АМН в эякуляте с подвижностью сперматозоидов (Kang-sheng L. I. U. et al., 2017; Peng L. P. et al., 2017). Уровень АМН в сперме может использоваться в качестве прогнозирующего фактора частоты оплодотворения при ЭКО и коррелирует с параметрами спермы у мужчин с олигоастенозооспермией (Wang Y. F. et al., 2017; Kang-sheng L. I. U. et al., 2017).

Дигидротестостерон (ДГТ) является 5α -восстановленным метаболитом тестостерона, который в основном преобразуется из него в целевых органах, таких как простата, кожа и печень (Benghuzzi H. A., 2017; Traish A. M. et al., 2019).

Преобразование тестостерона до ДНТ необходимо для развития нормальных мужских половых органов плода (Nassar G. N., Leslie S. W., 2018; Swerdloff R. S. et al., 2017). Низкие концентрации дигидротестостерона сильно коррелировали с нарушением сперматогенеза (Laursen R. J. et al., 2019; Cheng J. W., Ko E. Y., 2020). И, следовательно, был рекомендован как биомаркер при оценке качества спермы. С другой стороны, данные о ДНТ у мужчин с нормозооспермией, олигозооспермией и астенозооспермией были довольно спорными и не принесли ясности в сравнении с их определением в крови (Ismael Z. K., AL-Anbari L. A., Mossa H. A. L., 2017; Heráček J. et al., 2018; Starovlah I. M. et al., 2020).

Семенная плазма богата, одним из представителей класса рилизинг-гормонов гипоталамуса – тиреотропин-рилизинг-гормоном (TRH). Под его влиянием некапитативные сперматозоиды претерпевают ускоренную конденсацию и приобретают способность к оплодотворению. Как таковой, он относится к потенциальным биомаркерам мужской фертильности (Dick B. et al., 2020; Hernandez A., Martinez M. E., 2020; Wasilewski T. et al., 2020).

TRH – пептид, состоящий из 242 аминокислот, включает шесть копий аминокислотных последовательностей -Gln-His-Pro-Gly-, окруженных последовательностями аминокислот Lys-Arg или Arg-Arg. TRH вырабатывается нейронами гипоталамуса и стимулирует высвобождение тиреотропного гормона (ТТГ) и пролактина из передней доли гипофиза. Показана его значимая экспрессия в тестикулах, яичниках и максимальная в эндометрии (рис.1.2.3). Его функции в организме человека до конца не изучены, однако показано, что TRH обладает антидепрессантными и антисуицидальными свойствами, (Marangell LB, et al., 1997) и в 2012 году армия США предоставила исследовательский грант на разработку назального спрея TRH для предотвращения самоубийств среди своих рядов.

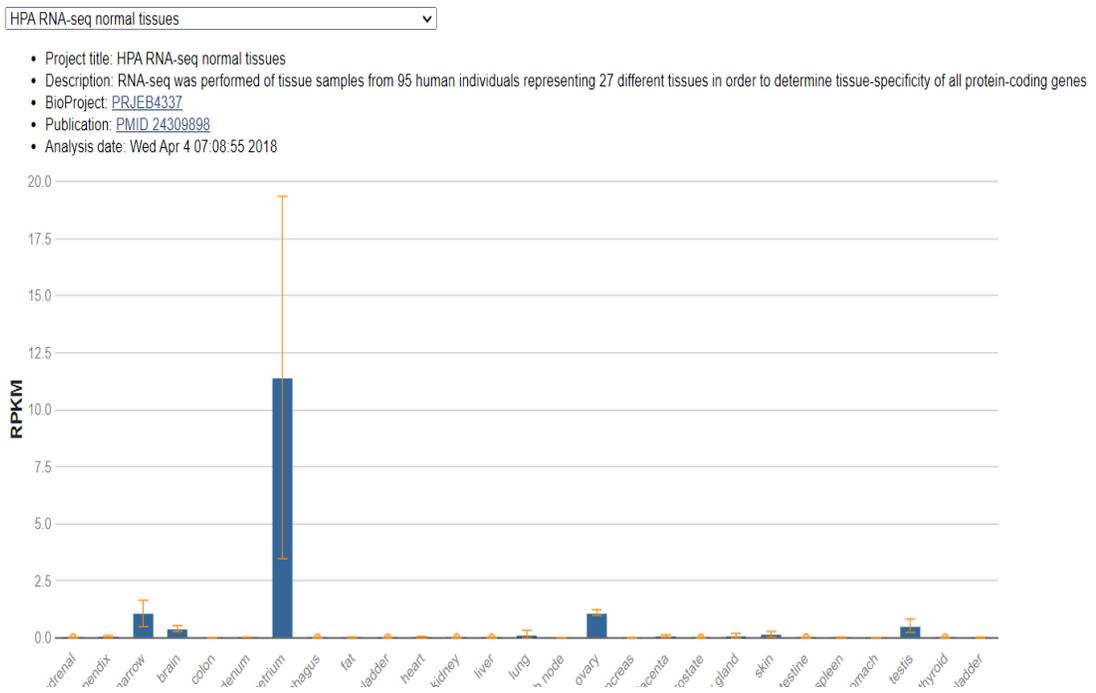


Рис1.2.3. Экспрессия гормона TRH в различных тканях человека.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7200>).

Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) также присутствует в семенной плазме и является еще одним потенциальным биомаркером мужской infertility. Как паракрин-действующее вещество, он участвует в развитии мужских половых клеток, действуя через свой рецептор в плазматической мембране сперматозоидов (Ipsa E. et al., 2019). Было показано, что его концентрация в семенной плазме значительно коррелирует с процентом морфологически нормальных сперматозоидов (Lee H. S. et al., 2016), а также с их общим количеством (Panner Selvam M. K. et al., 2019).

Последние данные свидетельствуют о важности этого белка, начиная с формирования фертильного статуса мужчины (Choubey M., 2020), оплодотворения и до успешной имплантации эмбриона в полость матки (Kumar A., Sridharn T. V., Rao K. A., 2019; Jena S. R. et al., 2021). ИФР-1 основной фактор роста отвечает за стимуляцию роста всех типов клеток и вызывает значительные

метаболические эффекты. Одним из важных метаболических эффектов ИФР-1 является его способность сигнализировать клеткам о наличии достаточного количества питательных веществ для гипертрофии и деления клеток (Геннадиник А. Г., Нелаева А. А., 2010). Эти сигналы также позволяют ИФР-1 ингибировать клеточный апоптоз и увеличивать выработку клеточных белков. Рецепторы ИФР-1 распространены повсеместно, что позволяет метаболическим изменениям, вызванным ИФР-1, происходить во всех типах клеток. Метаболические эффекты ИФР-1 имеют далеко идущие последствия и могут координировать белковый, углеводный и жировой обмен в различных типах клеток.

1.3. Активные формы кислорода и мужские половые гормоны.

За последние 40 лет сообщения о снижении качества спермы и его возможных последствиях для фертильности мужчин способствовали исследованиям влияния факторов окружающей среды и образа жизни на репродуктивный потенциал мужчин (Rolland M. et al., 2012; Kasman A. M., Del Giudice F., Eisenberg M. L., 2020; Panner Selvam M. K. et al., 2021). Реактивные формы кислорода, продуцируемые экзогенными и эндогенными факторами, являются высокорективными производными кислорода с периодами полураспада в диапазоне от нано- до миллисекунд. Изменение образа жизни, технологические достижения, возрастающий уровень загрязнения, употребление алкоголя, курение сигарет и вэйпинг, а также физический стресс являются одними из основных экзогенных причин производства АФК. Кроме того, множественные механизмы, включающие метаболизм в клеточной мембране, митохондриях, пероксисомах и эндоплазматической сети, могут продуцировать эндогенные АФК (Barazani Y. et al., 2014; Fatehi D. et al., 2018; Xie D. et al., 2018; Vessey W. et al., 2021).

Антиоксиданты защищают от избыточного уровня АФК с помощью ферментативных (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) и

неферментативных (витамины, стероиды) механизмов (Rakhit M. et al., 2013; Darbandi S., Darbandi M., 2016; Martínez-Holguín E. et al., 2020; Pourmasumi S., Sabeti P., 2020). В случаях, когда дисбаланс между окислителями и антиоксидантами склоняется к окислителям, возникает оксидативный стресс. В результате чрезмерное количество АФК может вызывать перекисное окисление липидов, нарушать функции ДНК, РНК, а также структуры белка в сперматозоидах и других клетках яичка (Darbandi S., Darbandi M., 2016; Otasevic V. et al., 2020).

Высокие уровни АФК могут увеличить вероятность бесплодия не только напрямую, вызывая ОС, но и косвенно, действуя через гипоталамические оси высвобождения гормонов (Rakhit M. et al., 2013; Darbandi S., Darbandi M., 2016; Martínez-Holguín E. et al., 2020; Pourmasumi S., Sabeti P., 2020). АФК снижают уровень мужских половых гормонов и нарушают гормональный баланс, который регулирует репродуктивную функцию мужчин и, таким образом, вызывают бесплодие. Эти эндокринные разрушители не только вмешиваются в связь между яичком и гипоталамо-гипофизарной единицей, но и создают перекрестные помехи между гипоталамо-гипофизарно-гонадной осью с другими гормональными осями гипоталамуса. Яичко, как основной мужской половой орган, занимается не только сперматогенезом, но и секрецией нескольких гормонов, которые необходимы для формирования мужского фенотипа во время половой дифференциации и нормального полового контакта и поведения (Jameson J.L., 2016; La Vignera S. et al., 2017). Следовательно, мешая нормальному гормональному выделению, АФК нарушают эти важные репродуктивные функции.

АФК, которые являются короткоживущими, нестабильными и высокореактивными компонентами, содержащими по крайней мере один атом кислорода, способны вырывать электроны из других молекул для достижения электронно-стабильного состояния. В этом процессе другая молекула теряет

электрон, после чего образуется новый радикал. Впоследствии этот радикал реагирует с другой соседней молекулой, таким образом, передавая статус радикала посредством реакции, называемой «цепной радикальной реакцией», пока два радикала не вступят в реакцию друг с другом, образуя стабильную связь. Эти реакции усиливают степень изменений в клеточных структурах (Bisht S. et al., 2017; Gosalvez J. et al., 2017; Agarwal A. et al., 2020).

Окислительный стресс, возникающий из-за повышенной выработки АФК или снижения доступных антиоксидантов, может вызвать перекисное окисление липидов в клетках Лейдига и половых клетках, повреждение липопротеинов, агрегацию и фрагментацию белков, и ингибирование стероидогенных ферментов (Darbandi S., Darbandi M., 2016). ОС яичек вызывает снижение выработки тестостерона в результате повреждения клеток Лейдига (Arafa M. et al., 2019; Cito G. et al., 2020). При нормально стероидогенезе также происходит генерация АФК, которые в основном продуцируются митохондриальным дыханием и каталитическими реакциями стероидных ферментов цитохрома P450 (Baskaran S. et al., 2021). Генерируемые таким образом АФК, в свою очередь, были идентифицированы как ингибирующие последующую выработку стероидов и повреждающие митохондриальные мембраны сперматозоидов (Dutta S. et al., 2020). ОС связан с увеличением числа незрелых сперматозоидов через косвенное влияние на выработку мужских гормонов, что коррелирует с уровнем сперматогенеза (Agarwal A. et al., 2020).

Сообщалось, что системные гормоны (тестостерон, эстрадиол) могут регулировать общую антиоксидантную способность спермы. Очевидно, что некоторые гормоны, такие как тестостерон, могут действовать как антиоксиданты для защиты сперматозоидов и других клеток яичка от повреждения, вызванного АФК (Han R. Y. et al., 2018; Cannarella R. et al., 2019). Наблюдались прямые и косвенные взаимосвязи между уровнями тестостерона и антиоксидантов, таких как селен, коэнзим Q10 и цинк у бесплодных мужчин

(Banihani S. A., 2018; Darbandi M. et al., 2018). Хотя сообщалось, что тестостерон может вызывать фрагментацию ДНК в клетках Сертоли и половых клетках путем стимуляции каспазной активности (Gill-Sharma M. K., 2018), долгосрочные эффекты антиоксидантов могут изменять уровни тестостерона (Darbandi M. et al., 2018). Тестикулярный эстрадиол интенсивно продуцируется во время окислительного стресса, а затем ингибирует освобождение тестостерона. После воздействия АФК активность ароматазы возрастает, что приводит к увеличению выработки эстрадиола.

На основные гормональные регуляторы мужской репродуктивной функции может влиять нарушение баланса между продукцией АФК и механизмом антиоксидантной защиты мужской репродуктивной системы. Неконтролируемая генерация АФК может непосредственно повредить репродуктивные ткани или нарушить нормальные регуляторные механизмы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и ее перекрестное взаимодействие с другими эндокринными осями, что негативно скажется на репродуктивной функции мужчины (Darbandi M. et al., 2018).

1.4. Полиморфные варианты антиоксидантных генов и мужское бесплодие.

Ферменты, участвующие в свободно-радикальных процессах, такие как супероксиддисмутаза (SOD), синтаза оксида азота (NOS), каталаза (CAT) и параоксоназа (PON) в значительной степени представлены в семенной плазме и сперматозоидах (Kumar N., Singh A. K. 2018; O'Flaherty C., 2019; Scarlata E., O'Flaherty C. 2020). Полиморфные варианты генов этих ферментов могут вызывать мужскую infertility по-разному. Поскольку генетические полиморфизмы являются важным этиологическим фактором мужского бесплодия, они могут значительно способствовать возникновению infertility, особенно в условиях окислительного стресса (Mahbouli S. et al.,

2021). До настоящего времени сообщалось, что функциональные полиморфные варианты генов *SOD*, *NOS*, *CAT* и *PON* связаны с мужским бесплодием.

Полиморфные варианты генов *SOD*, *NOS*, *CAT* и *PON* могут являться потенциальными генетическими маркерами мужского бесплодия. Поскольку частота мужского бесплодия продолжает расти, анализ его ассоциаций с полиморфными вариантами антиоксидантных генов может не только помочь понять роль антиоксидантного сигнального пути в мужском бесплодии, связанном с АФК, но и облегчить оценку его потенциала в качестве генетических маркеров для диагностики и оценки риска мужского бесплодия в клинике.

У млекопитающих был идентифицирован ряд генов, участвующих в сперматогенезе, в том числе *SOD*, *NOS*, *CAT* и *PON* (García Rodríguez A. et al., 2019; Yin Y. et al., 2020; Mahbouli S. et al., 2021). Ферменты, кодируемые этими генами, широко участвуют в клеточном антиоксидантном ответе, синтезе и восстановлении глутатиона и окислительно-восстановительных циклах тиола во время сперматогенеза или функционирования сперматозоидов.

Каталаза и супероксиддисмутаза – важные ферменты, защищающие сперму от окислительного повреждения пероксидом водорода и супероксидом. Механизм функционирования супероксиддисмутазы включает последовательное восстановление и окисление ионов металла переменной валентности в активном центре фермента. Этот фермент входит в группу антиоксидантов-катализаторов прямого действия. В зависимости от ткани содержание и активность фермента различны.

Ген *SOD1* человека локализован на 21-й хромосоме (21q22.11). Давно известно, что семенная активность *SOD* положительно связана с концентрацией и общей подвижностью, и отрицательно связана с фрагментацией ДНК сперматозоидов. На крысиных моделях было показано, что супероксиддисмутаза участвует в развитии тестикул и сперматогенезе (Rahali D. et al., 2020). Транскрипты мРНК *SOD* были идентифицированы в тестикулах крыс (Nomma T.

et al., 2019)., а их самый высокий уровень был обнаружен в канальцах непосредственно перед спермиацией (выход сперматозоидов в просвет канальцев). Мышиные модели нулевых мутантов *SOD1* показали отсутствие подвижных сперматозоидов в их эякуляте (Noblanc A., Klaassen A., Robaire B., 2020). Кроме того, ускоренное повреждение сперматогенных клеток наблюдалось у мышей с нокаутом *SOD1* в условиях теплового стресса (Sakellariou G. K. et al., 2018). Следовательно, генетические нарушения или функциональные полиморфизмы *SOD1* могут привести к нарушению сперматогенеза.

Каталаза в семенной плазме, катализируя разложение пероксида водорода до кислорода и воды, участвует в поддержании нормального уровня ОС и защите сперматозоидов от потенциально токсичных АФК (Marzec-Wróblewska U. et al., 2019; Rubio-Riquelme N. et al., 2020). Ген каталазы локализован на хромосоме 11 (11p13) и состоит из 13 экзонов. Ген каталазы кодирует один единственный белок из 526 аминокислот. Длина гена каталазы составляет 34 т.п.н. (Glorieux C., Calderon P. B., 2017). Наиболее изученным полиморфным вариантом является *C262T*. Он оказывает сильное влияние на активность каталазы, снижая ее, и ассоциирован с риском возникновения ишемического инсульта (Karahalil B., Elkama A., Orhan G., 2017), синдрома поликистоза яичников (Arslan A. O. et al., 2019) и некоторыми видами рака (Moradi M. T., Khazaei M., Khazaei M., 2018; Cosma A. S. et al., 2019; Datkhile K. D. et al., 2020). Ферментативная активность каталазы связана с низким качеством сперматозоидов (Rubio-Riquelme N. et al., 2020). В исследовании Sabouhi S. сообщалось, что генотип *CAT- 262T/T* отрицательно коррелирует с infertility у идиопатически бесплодных мужчин Sabouhi S. et al., 2015).

Синтазы оксида азота (NOS) – это семейство ферментов, которые катализируют выработку оксида азота (NO) из L-аргинина, который считается антиоксидантом, удаляющим АФК в низких концентрациях (Sharma G. N., Gupta

G., Sharma P., 2018; Ali S. S. et al., 2020; Otasevic V. et al., 2020). Доказана роль NO в подвижности, жизнеспособности, метаболизме и акросомальной реакции сперматозоидов (Staicu F. D., Matas Parra C., 2017; Muneer A., Pozzi E., Cakir O.O., 2020). У млекопитающих были идентифицированы три изофермента NOS: нейрональная (nNOS, NOS1), макрофагальная (iNOS, NOS2) и эндотелиальная (eNOS, NOS3) (Жигачева И. В., Васильева С. В., 2018).

Ген *NOS3* расположен на 7-ой хромосоме (q35-36). В его состав входят 26 экзонов (Campedelli F. L., 2017; Elakkad A.M. et al., 2017). Наиболее изученными являются *4a/b* полиморфизмы четвертого интрона, *G894T* (Glu298Asp) полиморфизм седьмого экзона и *C786T* полиморфизм промотора гена эндотелиальной NO-синтазы (Casas J.P. et al., 2004; Hingorani A.D. et al., 1995; Naber C.K. et al., 2003).

В тестикулах eNOS отвечает за синтез NO во время сперматогенеза, а генетические варианты *eNOS* могут быть потенциальным фактором риска нарушения сперматогенеза. Несколько аллелей *eNOS* были ассоциированы с дефектами спермы в различных этнических популяциях. В популяции египетских мужчин с олигоастенотератозооспермией наблюдалась значительная корреляция между полиморфным вариантом *eNOS T786C* и *G894T* и ухудшением параметров спермограммы и повышенным окислительным стрессом (Mostafa T. et al., 2015). В иракской популяции вариант eNOS 894G>T был ассоциирован с астенозооспермией (Hade I. M., Abdul-Hassan I. A., 2019). Аналогичные результаты были получены в китайской когорте (Yu Q. et al., 2014). У корейских бесплодных мужчин низкая морфология сперматозоидов была ассоциирована с полиморфным вариантом *eNOS 4a4b* (вариант последовательности с переменным числом повторов тандема *4a4b* в интроне 4) (Yun Y.J. et al., 2008). У иранских мужчин аллели *eNOS 786C*, *894T* и *a* были связаны со снижением параметров спермы (Safarinejad M.R., 2010).

Параоксоназа (PON) – фермент, ассоциированный с липопротеинами высокой плотности, который предотвращает окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности. Параоксоназа существует в двух формах – свободной и мембраносвязанной. Концентрация фермента в органах и тканях в несколько раз превосходит содержание свободной параоксоназы в плазме крови. PON обладает антиоксидантной функцией и защищает клетки от окислительного стресса. Семейство *PON* состоит из трех генов: *PON1*, *PON2*, *PON3*. Они локализованы на 7-ой хромосоме. *PON1* (7q21.3) состоит из 27 т.п.н. и содержит 9 экзонов. Наиболее изученный полиморфизм *Q192R* гена – замена глутамина (Q) на аргинин (R) в первичной структуре белка. Она приводит к изменению концентрации фермента (Shunmoogam N., Naidoo P., Chilton R., 2018).

Полиморфные варианты *PON1* играют важную роль в повышении риска развития многих заболеваний. Были обнаружены ассоциации между полиморфными вариантами гена *PON1* и некоторыми видами рака (Pan X. et al., 2019; Farmohammadi A. et al., 2020; Santana I. T. S. et al., 2020), ишемической болезнью сердца (Deng Z., Xiang H., Gao W., 2020; Ashiq S., Ashiq K., 2021), высоким соотношением ЛПНП/ЛПВП (Alharbi K. K. et al., 2017; Mahrooz A. et al., 2019) и псориазом (Hernández-Collazo A. A. et al., 2020). Белки PON, локализованные в семенных канальцах и сперматозоидах, участвуют в патогенезе мужского бесплодия, а наличие полиморфного варианта *PON1 192Q/R* снижает риск идиопатического мужского бесплодия (Behrouzi S. et al., 2018; Mahbouli S. et al., 2021).

Система антиоксидантных ферментов, может быть, одним из ключевых компонентов, которые играют защитную роль против повреждения АФК во время сперматогенеза и функционирования сперматозоидов. Следовательно, генетический полиморфизм в важнейших генах антиоксидантных ферментов могут привести к дефектному сперматогенезу и мужской инфертильности.

1.5. Окислительный стресс и повреждение ДНК сперматозоидов

Одна из основных причин нарушения функционирования сперматозоидов – окислительный стресс (Гуськов Е. П. и др., 1990; Кириленко Е. А., Онопко В. Ф., 2017; Гамидов С.И. и др., 2020). Он не только нарушает целостность ДНК мужских половых клеток, но и снижает их способность к оплодотворению из-за повреждения белков и липидов в плазматической мембране сперматозоидов. Причины возникновения такого окислительного стресса, по-видимому, связаны с митохондриями сперматозоидов, которые имеют тенденцию генерировать высокие концентрации супероксидного анион-радикала в качестве прелюдии к вступлению в собственный апоптотический каскад. К сожалению, эти клетки имеют очень слабую способность реагировать на такую атаку, потому что они обладают только первым ферментом на пути восстановления базовой эксцизии (BER) – 8-оксогуаниновой гликозилазой 1 (OGG1). Последний успешно создает абазальный участок, но сперматозоиды не могут дальше обрабатывать окислительное повреждение, потому что им не хватает нижестоящих белков (APE1, XRCC1), необходимых для завершения ремонта ДНК. Ответственность за продолжение пути BER перед инициацией S-фазы первого митотического деления лежит на ооците. Если на этой стадии ооцитом будет сделана ошибка, будет создана мутация, которая будет представлена в каждой клетке организма. Высокая распространенность окислительного повреждения ДНК у сперматозоидов инфертильных мужчин может иметь последствия для здоровья детей, зачатых в программах ВРТ и служит движущей силой для текущих исследований происхождения генерации свободных радикалов в зародышевой линии.

Первое предположение о том, что окислительный стресс может играть роль в этиологии нарушения функции сперматозоидов, было показано одним из пионеров современной андрологии, доктором Джоном Маклеодом (MacLeod J., 1943). Он опубликовал важную работу, в которой продемонстрировано, что в

оксигенированной среде человеческие сперматозоиды быстро теряют подвижность, но это обратимо в присутствии каталазы. Мнение о том, что сперматозоиды способны генерировать АФК, например, перекись водорода, было подтверждено Тошиком и Уолтоном в статье, опубликованной в журнале Nature в 1964 году (Tosic J., Walton A., 1946). В этой и последующей статье, опубликованной в 1950 году (Tosic J., Walton A., 1950), эти авторы представили впечатляющие биохимические доказательства того, что сперматозоиды быка могут генерировать перекись водорода, и этот активный метаболит нарушает функционирование сперматозоидов.

Идея о том, что окислительный стресс может также быть фактором этиологии дефектного функционирования сперматозоидов человека, была выдвинута независимо в 1987 году Aitken и Clarkson, и Alvarez с соавторами (Alvarez J.G. et al., 1987; Aitken, Clarkson, 1987).

Важность окислительного стресса в механизмах повреждения ДНК сперматозоидов также указывается при рассмотрении стратегий репарации ДНК, которые эти клетки могут использовать. В субклеточную структуру ядра и митохондрий сперматозоидов включена 8-оксогуаниновая гликозилаза (OGG1) (Garcia-Rodriguez A. et al., 2018; Rashki Ghaleno L. et al. 2021). По величине выхода 8-оксогуанин является наибольшим продуктом, образующимся при воздействии АФК на нуклеиновые кислоты. Поэтому в настоящее время 8-оксогуанин является одним из основных маркеров окислительного стресса. Когда сперматозоид подвергается окислительной атаке, OGG1 немедленно отсекает остатки 8ОНdG из ДНК, высвобождая окисленное основание во внеклеточное пространство. Следующий фермент системы BER – APE1, затем разрезает ДНК в фосфатных группах 3' и 5' до необоснованного сайта, оставляя 3' - ОН и 5'-фосфатные концы, готовые для вставки нового основания. Сперматозоиды не обладают этим ферментом (Rashki Ghaleno L. et al. 2021). В результате они переносят свои абазические участки в ооцит для продолжения процесса

восстановления. Со своей стороны, ооцит участвует в цикле восстановления ДНК сразу после оплодотворения и приостанавливает S-фазу до тех пор, пока эта активность не будет завершена (Gunes S., Sertyel S., 2018; Stringer J. M. et al., 2020).

Ген *hOGG1* кодирует фермент BER, удаляющий из ДНК остатки 8-оксогуанина, который образуется под влиянием АФК. В клетках человека ген *hOGG1* локализован в коротком плече хромосомы 3 (3p25/26) (Farías J. G. et al., 2018). Учитывая склонность к окислительному повреждению ДНК сперматозоидов и сильную зависимость от OGG1 для расщепления поврежденных базовых аддуктов до оплодотворения, не удивительно, что факторы, препятствующие активности OGG1, оказывают глубокое влияние на фертильность и здоровье потомства.

Окислительный стресс является основным патологическим механизмом, ответственным как за мужское бесплодие, так и за повреждение ДНК в зародышевой линии. Когда он возникает в зрелой гамете, то образуются аддукты 8ОНdG, которые удаляются OGG1; однако, остальная часть пути BER завершается в женской зародышевой линии. Аберрантное или неэффективное восстановление со стороны ооцита может вызвать мутации у потомства, которые будут влиять на траекторию здоровья последнего. Мутации в гене *OGG1* также являются важным вкладом в этом отношении. Прямое доказательство этого причинного механизма, посредством которого мужские и женские зародышевые линии вступают во взаимодействие, чтобы увеличить мутационную нагрузку, которую несет потомство (окислительное повреждение ДНК, приобретаемые в сперматозоидах, сопровождающееся несовершенным или неполным восстановлением в ооците), в настоящее время отсутствуют. Роль, которую играет индустрия искусственного зачатия в содействии передачи повреждённой ДНК в ооцит в результате широкого использования ИКСИ, также заслуживает детального изучения (Aitken R. J., Vakos H. W., 2021).

Чтобы глубже понять влияние окислительного стресса на процессы сперматогенеза необходимо исследовать генетические предикторы и особенности развития окислительного стресса при патозооспермии.

В настоящее время не установлены все возможные этиологические факторы развития фрагментации ДНК сперматозоидов. С одной стороны есть многочисленные данные о возникновении ДНК фрагментации при нарушении равновесия «прооксидант–антиоксидант», и соответственно увеличении активных форм кислорода или свободных радикалов в сперме (Гуськов Е.П. и др. 1990; Aitken R.J. et al., 2012; Walczak-Jedrzejowska R. et al., 2013; Ко Е.У. et al., 2014). С другой, противоречивость проблеме придает тот факт, что во многих исследованиях показано отсутствие значимой корреляции между традиционными параметрами спермы и фрагментацией ДНК сперматозоидов (Fraser L. 2004; Patrizio P. et al., 2008; Das M. et al., 2013; Метелев А. Ю., и др. 2015). Так же показано, что 25–40 % мужчин с нормальными показателями спермограммы и с нормальной интенсивностью свободно-радикальных процессов и уровнем антиоксидантных ферментов имеют бесплодие и уровень фрагментации ДНК сперматозоидов составляет более 25 % (Giwerzman A. et al., 2010; Bungum M. et al., 2011; Avendaño C., Oehninger S. 2011). Таким образом, с учетом вышеуказанных проблемных вопросов актуальность приобретает данное исследование, целью которого является изучение прогностической значимости различных генетических и биохимических показателей спермы для понимания механизмов мужского бесплодия и повышения фертильности мужчин.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн 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 различной 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 семиологического анализа, согласно пятому руководству ВОЗ (WHO, 2010) нами были отобраны пять исследуемых групп (Таблица 2.1.1)

Характеристика исследуемых групп, сформированных на основе спермограммы.

Исследуемая группа	Описание группы
контроль (доноры)	мужчины с доказанной фертильностью, показатели спермограммы соответствуют нормативным значениям на основании руководства ВОЗ (WHO, 2010)
астенозооспермия	концентрация сперматозоидов в норме, подвижность сперматозоидов А+В менее 40%, морфология по строгим критериям Крюгера более 4% (WHO, 2010)
олигозооспермия	концентрация сперматозоидов менее 15 млн/мл, подвижность сперматозоидов А+В более 40% (WHO, 2010)
тератозооспермия	концентрация сперматозоидов в норме, подвижность сперматозоидов А+В более 40%, морфология по Крюгеру менее 4% (WHO, 2010);
олигоастенозооспермия	концентрация сперматозоидов менее 15 млн/мл, подвижность А+В менее 40% (WHO, 2010).

Исследование выполнено с соблюдением Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и статей 20, 22, 23 Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 26.05.2021). Все исследования проводились с ИДС пациентов (приказ Министерства здравоохранения России от 19.06.2003г №266). Исследование проведено по протоколу, одобренному локальным независимым этическим Комитетом по биоэтике Академии биологии и биотехнологии ЮФУ (протокол №4 от 17.04.2014).

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Семиологический анализ (спермограмма)

Эякулят получали путем мастурбации и семяизвержения в чистый контейнер с широким горлом в специальной комнате рядом с лабораторией. На

крышке и сбоку контейнера маркируется ФИО пациента, его возраст, количество дней полового воздержания, а также дата и время сдачи биологического материала. Воздержание должно составлять от двух до семи дней. Контейнер с образцом оставляют при комнатной температуре для разжижения семени не менее чем на 30 минут, но не более чем на 1ч.

После разжижения эякулята проводится оценка его внешнего вида, объема и рН спермы.

Для определения количества и параметров подвижности сперматозоидов использовали камеру Маклера с сеткой, для прямого микроскопа (Sefi Medical, Израиль). Верхняя часть служит в качестве покровного стекла и имеет сетку в центре с ячейкой 1 кв. мм, поделенной на 100 квадратов размером 0,1 x 0,1 мм. Для анализа необходима маленькая некалиброванная капля хорошо смешенного неразбавленного материала, которую надо расположить в центре камеры с помощью серологической пипетки и закрыть верхней частью камеры. Количество сперматозоидов в любой из 10 клеток камеры соответствует концентрации в млн/мл; рекомендуется использовать микроскоп с объективом 20х.

Анализ морфологии сперматозоидов проводили в соответствии со строгими критериями Крюгера (Kruger T.F., 1988). Для этого подготавливали высушенный и окрашенный по методу Diff-Quik мазок эякулята на предметном стекле.

Путем центрифугирования эякулята при 2000 об/мин в течение 10 минут получали спермоплазму.

2.2.2. Хемилюминесцентный анализ в системе H_2O_2 – люминол

Хемилюминесценция очень чувствительна и реагирует с различными АФК при нейтральном рН. В присутствии подходящего катализатора, этот тест использует выброс света для измерения внеклеточных и внутриклеточных АФК

с использованием люминола или люцигенина в качестве зонда (Homa S.T. et al., 2019). Измерение интенсивности свободно-радикальных процессов с использованием люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталево́й кислоты) наиболее распространенный метод измерения уровня АФК.

Метод ХЛ базируется на свободно-радикальном распаде H_2O_2 при воздействии металлов переменной валентности на HO_2^* и OH^* , которые, в свою очередь, вызывают интенсивную окислительную ХЛ люминола (Владимиров Г.К. и др., 2016).

Анализ ХЛ проводили на приборе Auto Lumat Pius LB953 (Germany). Для подсчета фотонов применяли ФЭУ-37 (Россия).

2.2.3. Метод иммуноферментного анализа.

При исследовании тестостерона, дегидротестостерона и эстрадиола в наборах «Dihydrotestosterone» (DRG, Германия), «СтероидИФА-тестостерон-01» (Алкор Био, Россия) и «ДРГ Эстрадиол ИФА» (DRG, Германия) использован «конкурентный» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Принцип метода заключается в следующем: немеченый антиген (дигидротестостерон или тестостерон или эстрадиол, соответственно, присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляли ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливалась добавлением стоп-раствора. Степень окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации определяемого гормона в образце. Интенсивность развившегося окрашивания определяли, измеряя абсорбцию в лунках при длине волны 450 нм, используя две длины волны сравнения в

диапазоне 600-630 нм и 405 нм. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию гормона в определяемых образцах.

При исследовании антимюллерова гормона в наборе «AMHGenII» (Beckman Coulter, США) использован энзиматически усиленный «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. В ходе постановки стандарты, контроли и образцы инкубировали в лунках микропланшета, покрытых антителами к АМГ. После инкубации и промывки детектирующие анти-АМГ антитела, конъюгированные с биотином, вносили в лунки микропланшета. После второй инкубации и промывки, в лунки вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза (стрептавидин-HRP). После третьей инкубации и промывки в лунки вносили субстрат тетраметилбензидина (ТМБ). На последнем этапе процедуры в лунки вносили стоп-раствор (кислота). Интенсивность развившегося окрашивания определяли, измеряя абсорбцию в лунках при длине волны 450 нм, используя длину волны сравнения в диапазоне 600-630 нм. Измерение абсорбции прямо пропорционально концентрации определяемого гормона в образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию гормона в определяемых образцах.

При исследовании инсулиноподобного фактора роста-1(IGF-1) и белка-1 связывающего инсулиноподобный фактор роста-1(IGFBP-1) в наборах «IGF-1-ELISA» и «IGFBP-1-ELISA» (DSL, США) использован энзиматически усиленный «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. В ходе постановки стандарты, контроли и образцы инкубировали в лунках микропланшета, покрытых антителами. После инкубации и промывки детектирующие антитела, конъюгированные с биотином, вносили в лунки микропланшета. После второй инкубации и промывки, в лунки вносили конъюгат ЕК. После третьей инкубации и промывки в лунках вносят субстрат S.

На последнем этапе процедуры в лунки вносят стоп-раствор SL. Интенсивность развившегося окрашивания определяли, измеряя абсорбцию в лунках при длине волны 450 нм, используя длину волны сравнения в диапазоне 600-630 нм. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию в определяемых образцах.

2.2.4. Анализ полиморфизмов исследуемых генов.

В таблице 2.2.4.1 представлены полиморфные варианты, изученных нами генов.

Таблица 2.2.4.1.

Полиморфные локусы изучаемых генов.

Ген	Продукт	SNP	rs	Варианты генотипа
<i>PON1</i>	Параоксоназа 1	Q192R	662	QQ, QR, RR
<i>SOD1</i>	Супероксиддисмутаза 1	G7958A	4998557	GG, GA, AA
<i>CAT</i>	Каталаза	C262T	1001179	CC, CT, TT
<i>NOS3</i>	Эндотелиальная синтаза азота	C786T	2070744	CC, CT, TT
<i>hOGG1</i>	8-оксогуанин гликозилаза	Ser326Cys	1052133	Ser/Ser, Ser/Cys, Cys/Cys

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). С помощью горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле проводили разделение продуктов амплификации.

2.2.5. Сравнение выборок по частотам генотипов и аллелей.

Распределение частот генотипов и аллелей соответственно равновесию Харди-Вайнберга определяли в программе «Hardy-Weinbergequilibriumcalculator» (www.oege.org/software/Hardy-Weinberg). С помощью критерия χ^2 проводили оценку различий в распределении аллельных

вариантов в исследуемых группах. По отношению шансов (OR-oddsratio, с 95% доверительным интервалом (CL)) судили о риске развития патозооспермии.

2.2.6. Методы статистического анализа

Для исследования взаимосвязи изученных показателей использовали линейную корреляцию Пирсона (r).

Моделирование межгенных взаимодействий полиморфных локусов изучаемых генов проводили с помощью программы «Multifactor Dimensionality Reduction» (версия 3.0.2., <https://sourceforge.net/projects/mdr>).

Анализ биохимических и генетических параметров, их взаимосвязи и изменений в процессе сперматогенеза был выполнен с помощью мультифакторного анализа (Multiplefactoranalysis) (PagesJ., 2014).

2.2.7. Контроль качества проводимых исследований.

Молекулярно-генетические исследования проводились на оборудовании, систематически проходящим сертификацию и проверку специалистами Росстандарт. Лаборатория эмбриогенеза ООО «Центр репродукции человека и ЭКО»; клиническая лаборатория медицинского центра «Наука», ЦКП «Высокие технологии ЮФУ» и лаборатория «биологии развития и организации генома» Академии биологии и биотехнологии им. Ивановского Южного федерального университета ведут внутренний контроль качества, а также аттестацию в системе ФСВОК.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Окислительный стресс сопровождает и/или является одним из ключевых патогенетических звеньев в развитии многих видов репродуктивной патологии. Известно, что продукция свободных радикалов и перекисное окисление липидов играют важную роль в регуляции физиологических функций семенника. Многочисленные исследования показали, что окислительный стресс является основной причиной тестикулярной дисфункции и оказывает непосредственное влияние на процессы сперматогенеза, нормальное функционирование сперматозоидов и вызывает их апоптоз (Хлобыстов В.В., 1977; Гуськов и др, 1990; Метелев А. Ю., и др. 2015; Савикина К. Г. и др., 2015; Кириленко Е. А., Онопко В. Ф., 2017).

На данный момент интенсивность окислительного стресса в эякуляте можно определить путем измерения уровня активных форм кислорода прямо или косвенно.

Динамику изменений редокс-гомеостаза спермоплазмы оценивали по высоте быстрой вспышки и светосумме (Sm) активированной ХЛ. При этом амплитуда быстрой вспышки ХЛ (H) характеризует резистентность тканей к перекисному окислению липидов. Ее величина прямо пропорциональна окисляемости тканевых липидов и обратно пропорциональна содержанию природных антиоксидантов в биосубстрате. Светосумма ХЛ (Sm) показывает скорость расходования свободных радикалов липидной природы, вследствие их взаимодействия с антиоксидантами, и обусловлена, в первую очередь, уровнем прооксидантов в системе, а влияние антиоксидантных компонентов носит вторичный характер (Азарова А. Э. и др. 2005; Савикина К.Г., 2015; Прокофьев, В. Н., и др. 2017).

В таблице 3.1.1. представлены результаты исследования люминолзависимой ХЛ эякулята пациентов с различными типами патозооспермии.

Таблица 3.1.1.

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

Исследуемые группы	Показатели хемилюминесценции эякулята			
	Высота светосуммы быстрой вспышки H ₂ O ₂ -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (p)	Светосумма свечения за 10 сек. H ₂ O ₂ -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (p)
Нормозооспермия (контроль)	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±2,86 и 24,44±3,06 мм – соответственно. При астенозооспермии высота быстрой вспышки была увеличена на 46%, а при тератозооспермии на 42% по сравнению с контролем (рис. 3.1.1.) (Савикина К.Г., 2015).

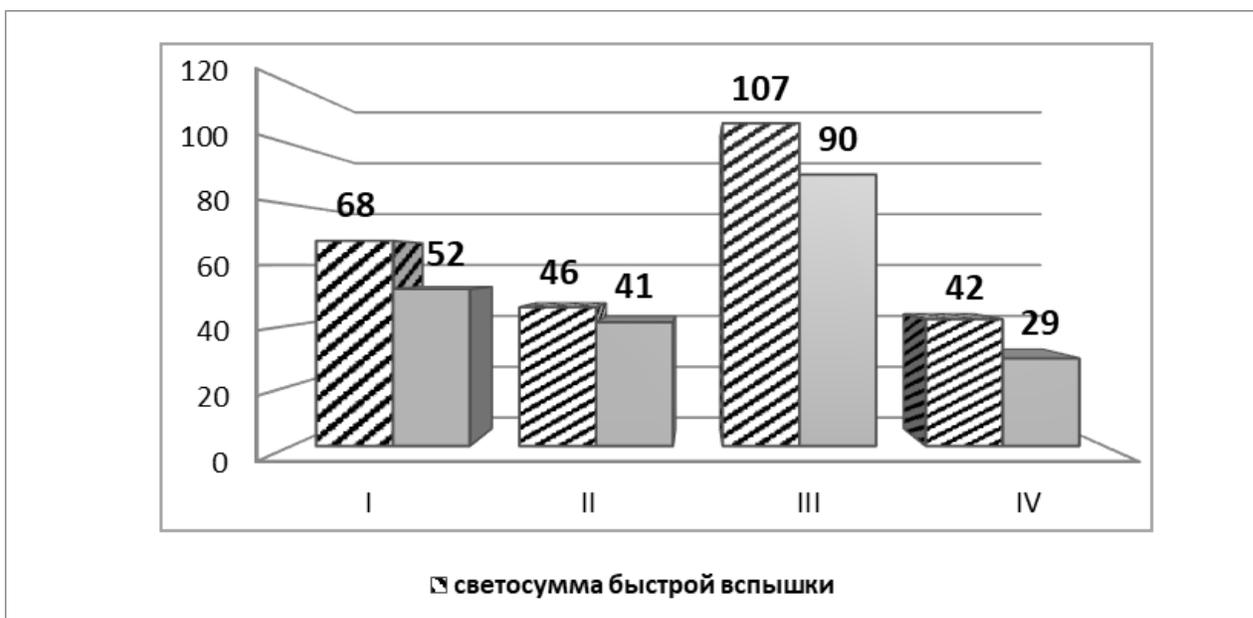


Рисунок 3.1.1. Интенсивность изменений ХЛ в спермоплазме при различных типах патозооспермии (% к нормозооспермии): I – олигоастенозооспермия; II – астенозооспермия; III – олигозооспермия; IV – тератозооспермия (Савикина К.Г., 2015).

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 S_m 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).

Интенсивность свободно-радикальных процессов и состояние антиоксидантной системы в первую очередь зависят от характера метаболических процессов в различных тканях. Большое значение имеют не только абсолютные величины анти- и прооксидантов, но их соотношение между собой, а также емкость антиоксидантной защиты. Окислители повреждают не только ДНК/РНК соматических клеток, но и генетический материал гамет. Хронический ОС приводит к гипоплазии клеток Лейдига (Целуйко С.С., 2008), которые являются главным источником тестостерона. Поэтому, следующим этапом работы стало изучение уровня тестостерона и эстрадиола в эякуляте инфертильных мужчин с различными типами патозооспермии.

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

В гормональном контроле сперматогенеза ведущую роль играют гормоны гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси и рилизинг-гормон гипоталамуса – тиреотропин-рилизинг-гормон (TRH).

В таблице 3.2.1. показаны результаты исследований уровня тестостерона (нмоль/л) в эякуляте бесплодных мужчин с разными видами патозооспермии.

Таблица 3.2.1.

Уровень ТТСТ (нмоль/л) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Нормозооспермия (контроль)	Олигозооспермия	Астенозооспермия	Олигоастенозооспермия	Тератозооспермия
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

Примечание. Здесь и далее p - достоверность различий относительно контроля.
 $\Delta\%$ - изменение показателя в % по сравнению с контролем.

Как следует из табл. 3.2.1, при астено-, олигоастено- и тератозооспермии наблюдается повышение на 77%, 35% и 68% уровня тестостерона в эякуляте относительно нормозооспермии фертильных мужчин. При этом максимальное значение уровня тестостерона выявлено в группе с тератозооспермией и минимальное – в группе с олигозооспермией. 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.

Эстрогены, традиционно, рассматриваются как ключевые половые гормоны, выполняющие важнейшие функции в женском организме. Однако, их роль в мужском организме остается недостаточно изученной, но не менее значимой. До 80% эстрогенов в организме мужчины образуется в результате ароматизации тестостерона. Поэтому, нарушение синтеза и метаболизма тестостерона у мужчин определенно приводят к нарушению синтеза и метаболизма эстрогенов. Эстрогены поддерживают обратную связь яичек с гипофизом и могут снижать уровень тестостерона. Но без эстрогенов тестостерон оказывает лишь ограниченное влияние на половое поведение (Савикина К.Г., 2015).

В таблице 3.2.2. показаны результаты исследований уровня эстрадиола (пг/мл) в эякуляте бесплодных мужчин с разными видами патозооспермии.

Таблица 3.2.2.

Уровень E2 (пг/мл) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Нормозооспермия (контроль)	Олигозооспермия	Астенозооспермия	Олигоастенозооспермия	Тератооспермия
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

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 тератооспермией содержание E2 находится в пределах контроля. В ходе исследования максимальное значение уровня эстрадиола отмечено у пациента с астенозооспермией, минимальное – у пациента из группы олигозооспермии. Максимальное среднеарифметическое значение отмечено в группе пациентов с астенозооспермией, минимальное среднеарифметическое значение выявлено в группе пациентов с тератооспермией. 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. При этом в механизмах поддержания гомеостаза организма изменения гормональной секреции представляет собой каскад взаимосвязанных реакций. Поэтому следующим этапом нашей работы было изучение содержания антимюллерова гормона (АМН), тиреотропин-рилизинг гормона (ТРН), дигидротестостерона (ДНТ), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) и белка, связывающего

инсулиноподобный фактор роста 1 (IGFBP1) в эякуляте бесплодных мужчин с разными видами патозооспермии. (Савикина К.Г., 2017).

В ходе исследования выявлено, что максимальное значение TRH зафиксировано в группе тератозооспермии, минимальное – в группе олигоастенозооспермии (Таблица 3.2.3). Максимальное среднеарифметическое уровня TRH в спермоплазме также отмечено группе тератозооспермии. Минимально среднеарифметическое значение TRH находится в группе пациентов с олигозооспермией (Савикина К.Г., 2017).

Таблица 3.2.3.

Уровень TRH (пг/мл) в эякуляте мужчин в норме и при разных видах патозооспермии.

	Нормозооспермия (контроль)	Олигозооспермия	Астенозооспермия	Олигоастенозооспермия	Тератозоспермия
Максимальное значение	267,6	202,2	216,0	216,0	271,7
Минимальное 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

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.

В таблице 3.2.4. показаны данные по изучению уровня IGF1 в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

Таблица 3.2.4.

Уровень IGF1 (нг/мл) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Контроль	Олигозооспермия	Астенозооспермия	Олигоастенозооспермия	Тератооспермия
Максимальное значение	20,2	15,9	27,2	18,4	27,6
Минимальное 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

Максимальное значение IGF1 зарегистрировано у пациента из группы тератозооспермии, минимальное – у пациента из группы олигоастенозооспермии. Максимальное среднеарифметическое значение также обнаружено в группе пациентов с тератозооспермией, минимальное – у пациентов с олигоастенозооспермией. В соответствии с критерием Манна-Уитни, 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).

В таблице 3.2.5. показаны данные по изучению уровня IGFBP1 в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией. Максимальное значение IGFBP1 зарегистрировано при астенозооспермии, минимальное – у пациентов с олиго- и олигоастенозооспермией. Максимальное среднеарифметическое значение также отмечено в контрольной группе, минимальное – в группе с олигоастенотератозооспермией. У пациентов с олигоастенозооспермией зарегистрировано достоверное снижение уровня IGFBP1 по сравнению с контрольной группой фертильных доноров спермы (Савикина К.Г., 2017).

Таблица 3.2.5.

Уровень IGFBP1 (нг/мл) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Контроль	Олигозоо-спермия	Астенозоо-спермия	Олигоастенозооспермия	Терато-спермия
Максимальное значение	1,082	0,464	1,802	0,464	0,658
Минимальное 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

В таблице 3.2.6. и 3.2.7. показаны данные по изучению уровня АМН и ДНТ в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией. Статистически достоверных различий в уровне этих гормонов между группами пациентов с разными типами патозооспермии не обнаружено (Савикина К.Г., 2017)

Таблица 3.2.6.

Уровень АМН (пг/мл) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Контроль	Олигоастенозоо спермия	Астенозоо спермия	Олигозоо спермия	Тератозоо спермия
Максимальное значение	23,9	24,6	3,7	0,4	24,6
Минимальное значение	13,4	0,0	0,0	0,0	0,9
Среднее значение	18,6±1,64	12,3±0,77	1,8±0,36	0,2±0,05	12,8±1,44
Достоверность по отношению к контролю	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 3.2.7.

Уровень ДНТ (пг/мл) в эякуляте мужчин с нормо- и патозооспермией.

	Контроль	Олигоастено зооспермия	Астенозоо спермия	Олигозоо спермия	Тератозоо спермия
Максимальное значение	19130	7089	4857	4375	10100
Минимальное значение	4823	4463	4797	3240	9214
Среднее значение	11977±678,1	5776±439,5	4827±390,5	3808±540,2	9657±864,5
Достоверность по отношению к контролю	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Чтобы проанализировать статистическую достоверность полученных данных нами были построены корреляционные матрицы, показывающие изменение гормонального профиля в эякуляте пациентов с патозооспермией (независимо от типа) и в контрольной группе фертильных доноров спермы.

В таблице 3.2.8. показаны коэффициенты корреляции исследуемых гормонов в группе фертильных доноров.

Таблица 3.2.8.

Коэффициенты корреляции между уровнями исследуемых гормонов в группе фертильных доноров.

	Возраст	TRH	IGF1	IGFBP1	TTST	E2	AMH	DHT
Возраст	1,00							
TRH	0,01	1,00						
IGF1	-0,29	0,61	1,00					
IGFBP1	-0,09	-0,06	0,12	1,00				
TTST	-0,05	0,45	0,52	-0,06	1,00			
E2	-0,01	0,39	0,44	0,05	0,84	1,00		
AMH	0,29	0,21	0,01	-0,36	0,11	0,36	1,00	
DHT	0,12	0,04	0,04	-0,13	0,34	0,31	0,42	1,00

Из представленного материала видно, что в эякуляте фертильных доноров существует достоверная корреляция между уровнем тестостерона и эстрадиола, а также TRH и IGF1 (Савикина К.Г., 2017).

В группе пациентов с патозооспермией независимо от ее типа была построена следующая корреляционная матрица (Таблица 3.2.9.).

Таблица 3.2.9.

Коэффициенты корреляции между уровнями исследуемых гормонов в группе пациентов с патозооспермией.

	Возраст	TRH	IGF1	IGFBP1	TTST	E2	AMH	DHT
Возраст	1,00							
TRH	-0,12	1,00						
IGF1	-0,21	0,65	1,002					
IGFBP1	-0,34	0,07	0,62	1,00				
TTST	0,63	-0,35	0,01	0,29	1,00			
E2	0,48	-0,20	-0,20	-0,08	0,70	1,00		
AMH	0,27	0,71	-0,02	-0,50	-0,38	-0,07	1,00	
DHT	-0,14	0,81	0,83	0,49	-0,07	-0,32	0,31	1,00

При сравнении уровней исследуемых гормонов, у пациентов с патозооспермией обнаруживается положительная корреляция по целому ряду показателей (Таблица 3.2.9). Уровень тестостерона достоверно изменяется в зависимости от возраста пациентов; уровень TRH положительно коррелирует с уровнем IGF1, а AMH с DHT. В свою очередь, IGF1 в группе пациентов с патозооспермией положительно коррелирует с уровнем IGFBP1 и DHT. 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).

На следующем этапе исследования был проведен анализ данных пациентов с патозооспермией в зависимости от ее типа. В группах пациентов с астенозооспермией и олигоастенозооспермией не были обнаружены корреляционные связи. В таблице 3.2.10 представлена корреляционная матрица, построенная на основе показателей пациентов с олигозооспермией.

Таблице 3.2.10

Корреляционные коэффициенты между уровнем исследуемых гормонов в группе инфертильных мужчин с олигозооспермией

	Возраст	TRH	IGF1	IGFBP1	TTST	E2
Возраст	1,00					
TRH	-0,27	1,00				
IGF1	0,09	0,39	1,00			
IGFBP1	0,06	-0,08	-0,26	1,00		
TTST	0,07	0,31	0,72	-0,08	1,00	
E2	0,04	0,74	0,81	-0,05	0,79	1,00

Из таблицы видно, что при сравнении уровней исследуемых гормонов у пациентов с олигозооспермией обнаруживается положительная корреляция эстрадиола и TRH, IGF1 и тестостерона. У инфертильных мужчин с олигозооспермией, так же, как и в группе фертильных доноров спермы, прослеживается положительная корреляция между уровнем тестостерона и эстрадиола.

Таблице 3.2.11

Корреляционные коэффициенты между уровнем исследуемых гормонов в группе инфертильных мужчин с тератозооспермией

	Возраст	TRH	IGF1	IGFBP1	TTST	E2
Возраст	1,00					
TRH	-0,05	1,00				
IGF1	-0,14	0,62	1,00			
IGFBP1	-0,34	0,00	0,44	1,00		
TTST	-0,33	0,21	0,15	-0,11	1,00	
E2	-0,42	0,16	0,09	0,25	0,31	1,00

В группе инфертильных мужчин с тератозооспермией уровень TRH положительно коррелирует с уровнем IGF1. Интересно, что в этой группе

пациентов отсутствует корреляция между уровнем TTSTи E2, которая прослеживалась в группе фертильных доноров спермы и пациентов с патозооспермией независимо от ее вида.

В эякуляте фертильных доноров спермы, как показало наше исследование, обнаружена корреляция между уровнями TRHи IGF1, AMHи DHT. Показано, что уровень тестостерона коррелировал с интенсивностью индуцированной ХЛ, а окислительный стресс снижает выработку тестостерона. При астенозооспермии отмечено достоверное увеличение уровня TTST, E2 и TRH. Значительное снижение количества TRHотмечено в эякуляте мужчин с олигозооспермией. В группе патозооспермии (независимо от ее типа) IGF1 положительно коррелирует с уровнем IGFBP1 и DHT (Савикина К.Г., 2017).

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

Инфертильность является социально-демографической и медицинской проблемой: во всем мире страдает данной патологией от 10 до 15% пар (Fainberg J., Kashanian J. A., 2019; Barati E., Nikzad H., Karimian M., 2020). Около половины случаев бесплодия вызваны нарушением репродуктивной функции у мужчин. В настоящее время установлен ряд факторов, определяющих мужское бесплодие: хромосомные аномалии, инфекции, эндокринопатии, уязвимость к стрессовым факторам, окислительный стресс и др.(Choy J. T., Eisenberg M. L., 2018; Hayden R. P., Flannigan R., Schlegel P. N., 2018; Ho T. T. T. et al., 2020; Fafula R. V. et al., 2018; Kamiński P. et al., 2020; Liu J. L. et al., 2020). Около 40-50% случаев мужского бесплодия обусловлено патозооспермией (Pandruvada S. et al., 2021). При этом остается недостаточно исследованным вопрос о роли полиморфных вариантов генов в развитии данной патологии. Особый интерес представляет исследование SNP генов, связанных с ферментами, принимающими участие в свободнорадикальных процессах при патозооспермии, поскольку по данным

ряда авторов окислительное повреждение сперматозоидов лежит в основе 30-80% мужского бесплодия (Barati E., Nikzad H., Karimian M., 2020; Bisht S. et al., 2017; Khosrowbeygi A., Zarghami N., 2007; Huang C. et al., 2018).

АФК обладают высокой реакционной способностью, образуются в результате метаболизма кислорода и присутствуют во всех аэробных организмах (Prieto-Bermejo R. et al., 2018). В зависимости от концентрации, места и времени воздействия АФК могут оказывать положительное или отрицательное воздействие на сперматозоиды. На нормальном физиологическом уровне АФК необходимы для подвижности, капацитации, гиперактивации, акросомальной реакции и, следовательно, оплодотворения (Agarwal A., Sengupta P., 2020; Di Meo S. et al., 2016). Избыточное производство свободных радикалов, превышающее антиоксидантную способность как сперматозоидов, так и семенной плазмы, известное как окислительный стресс, может привести к апоптозу, перекисному окислению липидов, низкому качеству сперматозоидов и повреждению их белков и ДНК (Aitken R. J., 2017; Subramanian V. et al., 2018).

В семенной плазме и сперматозоидах изучена активность NO-синтазы (NOS), а также антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и параоксоназы (PON) (Meseguer M. et al., 2007; Ammar O. et al., 2021). Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) генов этих ферментов являются важным этиологическим фактором мужского бесплодия, поэтому они могут значительно способствовать возникновению инфертильности, особенно в условиях окислительного стресса (Carrell D. T., Aston K. I., 2011). Также актуальным является изучение полиморфизмов гена 8-оксогуаниновой гликозилазы 1 (OGG1), поскольку данный фермент связан с идиопатическим бесплодием у мужчин (Jalilvand A., Karimi N., 2020). Анализ его взаимодействия с полиморфными вариантами антиоксидантных генов может способствовать определению его роли в антиоксидантном сигнальном пути при мужском бесплодии, связанном с развитием окислительного стресса, а также позволит

оценить его потенциал как генетического маркера для диагностики риска мужского бесплодия в клинической практике.

Для полиморфных маркеров *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T* и *hOGG1 Ser326Cys* проводили генотипирование и статистический анализ. Результаты представлены в таблицах 3.3.1 – 3.3.3. 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%.

В таблице 3.3.1 приведены результаты анализа частот распространения полиморфных вариантов изучаемых генов у мужчин с нормальной фертильностью и астенозооспермией. По результатам анализа нами не выявлено ассоциаций изучаемых полиморфных вариантов генов *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys*. В таблице 3.3.2 представлены результаты анализа частот распространения полиморфных вариантов генов *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* у мужчин с нормальной фертильностью и олигозооспермией. Как видно из представленных результатов у мужчин с олигозооспермией мы наблюдали увеличение частоты встречаемости аллеля -326Cys гена *hOGG1* в 2,22 раза ($p = 0,025$) (Таблица 3.3.2). Наличие аллеля 326Cys аллелей гена *hOGG1* ассоциировано с олигозооспермией.

Таблица 3.3.1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PON1 Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с астенозооспермией (случай) и нормозооспермией (контроль).

Генотип/аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-39)	χ^2	P	OR	(95% CL)
<i>PON1 Q192R</i>						
<i>QQ</i>	30 (60,0%)	27 (69,2%)			1,5	0,62-3,63
<i>QR</i>	18 (36,0%)	11 (28,2%)	0,811	0,368	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
<i>SOD1 G7958A</i>						
<i>GG</i>	35 (70,0%)	34 (88,0%)			2,91	0,95-8,9
<i>GA</i>	15 (30,0%)	4 (11,0%)	3,712	0,055	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
<i>CAT C262T</i>						
<i>CC</i>	30 (57,0%)	25 (65,2%)			1,19	0,5-2,83
<i>CT</i>	15 (37,0%)	13 (31,1%)	0,156	0,693	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
<i>NOS3 C786T</i>						
<i>CC</i>	8 (16,0%)	4 (10,3%)			0,6	0,17-2,16
<i>CT</i>	23 (46,0%)	20 (51,3%)	0,620	0,432	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
<i>hOGG1 Ser326Cys</i>						
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0%)	30 (76,9%)			3,67	1,3-10,35
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0%)	8 (20,5%)	1,264	0,261	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; χ^2 - частотное распределение хи-квадрат; p – p-значение;
OR- отношение шансов; CI - доверительный интервал

Таблица 3.3.2.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PONI Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с олигозооспермией (случай) и нормозооспермией(контроль).

Генотип/ аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-40)	χ^2	P	OR	(95% CI)
<i>PONI Q192R</i>						
QQ	30 (60,0%)	16 (40,0%)	3,557	0,06	2,25	0,96-5,26
QR	18 (36,0%)	22 (55,0%)			2,17	0,93-5,08
RR	2 (4,0%)	2 (5,0%)			1,26	0,17-9,39
Allele Q	0,780	0,675	2,506	1,114	0,59	0,3-1,14
Allele R	0,220	0,325			1,71	0,88-3,32
<i>SOD1 G7958A</i>						
GG	35 (70,0%)	29 (73,0%)	0,068	0,795	0,89	0,35-2,22
GA	15 (30,0%)	11 (27,0%)			1,13	0,45-2,84
AA	0	0				
Allele G	0,850	0,862	0,056	0,813	1,11	0,48-2,57
Allele A	0,150	0,138			0,9	0,37-1,53
<i>CATC262T</i>						
CC	30 (57,0%)	26 (64,0%)	0,649	0,421	1,38	0,63-3,06
CT	15 (37,0%)	12 (32,0%)			1,0	0,4-2,48
TT	5 (6,0%)	2 (4,0%)			0,47	0,09-2,58
Allele C	0,750	0,800	0,632	0,427	1,33	0,66-2,71
Allele T	0,250	0,200			0,75	0,37-1,53
<i>NOS3 C786T</i>						
CC	8 (16,0%)	5 (12,5%)	0,220	0,639	1,33	0,4-4,44
CT	23 (46,0%)	20 (50,0%)			1,17	0,51-2,7
TT	19 (38,0%)	15 (37,5%)			0,98	0,42-2,31
Allele C	0,390	0,375	0,042	0,838	0,94	0,51-1,72
Allele T	0,610	0,625			1,07	0,58-1,95
<i>hOGG1 Ser326Cys</i>						
Ser/Ser	33 (66,0%)	20 (50,0%)	2,350	0,126	0,82	0,37-1,82
Ser/Cys	17 (34,0%)	15 (37,5%)			1,16	0,49-2,77
Cys/Cys	0	5 (12,5%)			5,44	0,61-4,84
Allele Ser	0,830	0,687	5,05	0,025	0,45	0,22-0,91
Allele Cys	0,170	0,313			2,22	1,1-4,49

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

В таблице 3.3.3. 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 3.3.3.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *PONI Q192R*, *SOD1 G7958A*, *CATC262T*, *NOS3 C786T*, *hOGG1 Ser326Cys* для групп с патозооспермией (случай) и нормозооспермией (контроль).

Генотип/ аллель	Контроль (n-50)	Случай (n-79)	χ^2	p	OR	(95% CL)
<i>PONI Q192R</i>						
<i>QQ</i>	30 (60,0%)	43 (54,4%)	0,387	0,535	0,80	0,39-1,63
<i>QR</i>	18 (36,0%)	33 (41,7%)			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
<i>SOD1 G7958A</i>						
<i>GG</i>	35 (70,0%)	63 (79,8%)	1,593	0,207	1,69	0,75-3,82
<i>GA</i>	15 (30,0%)	15 (19,0%)			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
<i>CAT C262T</i>						
<i>CC</i>	30 (57,0%)	51 (64,6%)	0,272	0,602	1,21	0,59-2,52
<i>CT</i>	15 (37,0%)	25 (31,7%)			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
<i>NOS3 C786T</i>						
<i>CC</i>	8 (16,0%)	9 (11,4%)	0,568	0,451	0,68	0,24-1,88
<i>CT</i>	23 (46,0%)	40 (50,7%)			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
<i>hOGG1 Ser326Cys</i>						
<i>Ser/Ser</i>	33 (66,0%)	50 (63,3%)	0,098	0,755	0,89	0,42-1,87
<i>Ser/Cys</i>	17 (34,0%)	23 (29,2%)			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; χ^2 - частотное распределение хи-квадрат; p – p-значение; OR- отношение шансов; CI - доверительный интервал

Повреждение ДНК в результате окислительного стресса является основной причиной нарушения функционирования сперматозоидов. Высокий уровень окислительного стресса приводит к повреждению ДНК сперматозоидов, транскриптов РНК и теломер, и, следовательно, может служить общей причиной мужского бесплодия, привычного невынашивания, врожденных пороков развития, сложных психоневрологических расстройств и онкологических заболеваний у детей, рожденных от мужчин с дефектными сперматозоидами. Сперматозоиды очень уязвимы к окислительному стрессу из-за ограниченного уровня антиоксидантной защиты и усеченного механизма эксцизионной репарации оснований ДНК (base excision repair, BER) (Bisht S. et al., 2017).

Ген 8-оксогуанин-ДНК N-гликозилазы 1 человека кодирует ДНК-гликозилазу, которая участвует в эксцизионной репарации оснований 8-гидрокси-2-дезоксигуанина из окислительно поврежденной ДНК. Восстановление ДНК долгое время считалось невозможным в сперматозоидах человека из-за высокого уровня уплотнения ДНК в этих клетках. Однако подробное изучение пути эксцизионной репарации оснований в сперматозоидах человека выявило присутствие фермента, критически важного для этого пути, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы 1 (OGG1), которая входит в субклеточную структуру ядра сперматозоидов и митохондрий. Когда ДНК сперматозоидов подвергается окислительной атаке, OGG1 немедленно отсекает остатки 8OHdG из ДНК, создавая базовый сайт, высвобождая окисленное основание во внеклеточное пространство (Smith T. B. et al., 2013). Уровень 8OHdG в сперматозоидах человека значительно зависит от наличия полиморфного варианта *Ser326Cys* в гене *OGG1*. Полиморфный вариант *OGG1Ser326Cys*, ассоциирован с пониженной активностью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (Kiffmeyer W. R. et al., 2004). Пациенты с вариантом *Cys/Cys* демонстрируют более высокие уровни 8OHdG в сперматозоидах, чем гомозиготные носители дикого типа (*Ser/Ser*) (Chen S. S. S., Chiu L. P., 2018).

Проблема воздействия окислительного стресса на клетку может решаться на двух уровнях. Первичная атака АФК отражается антиоксидантной защитой клетки, прерывающей цепь биохимических событий с участием супероксидов. На втором уровне клетка распознает последствия сильного воздействия АФК и запускает систему репарации повреждений, или же вступает в апоптоз (Волков А. Н., 2020; Проскурнина Е. В. и др., 2020). В контрольной группе мы можем наблюдать отсутствие гомозигот мутантного типа и по гену *SOD1* и гену *hOGG1* (Table 1-3). Наличие полиморфных вариантов данных генов может повышать частоту свободно-радикального повреждения ДНК, что, в свою очередь, запускает активацию системы репарации. Так как наличие таких локусов связано с очень высоким риском возникновения мутаций в ДНК и их сохранением не только в сперматозоидах, можно предположить, что данные клетки жертвуют собой вступая в апоптоз.

Полиморфные варианты генов антиоксидантной системы и генов системы репарации ДНК анализируются на наличие ассоциаций с патозооспермией в различных этнических группах. Полученные данные дают противоречивые результаты. К примеру, исследование Garcia-Rodriguez (2018) показало, что полиморфизм *hOGG1Ser326Cys* ассоциирован с патозооспермией ($\chi^2=12,67$, $p=0,002$), конкретно, с аллелем *Cys* связано снижение концентрации (Garcia-Rodriguez A. et al., 2018). Однако, в своем исследовании полиморфизма *CATC262T* он обнаружил, что генотип *CC* был связан с повышенным риском мужского бесплодия ($OR = 1,976$; $CI=1,241-3,216$; $p=0,006$), в то время как генотип *CT* оказывал протективный эффект от бесплодия ($OR=0,479$; $CI= 0,293-0,783$; $p=0,003$). Функционально генотип *CT* показал более высокие концентрации фермента в семенной плазме, а также в 2,70 раза более высокие уровни активности, чем генотип *CC*. Следовательно, генотип *CAT -262CT* коррелирует с более низким риском мужского бесплодия (Garcia-Rodriguez A. et al., 2018). В исследовании BehrouziS., MashayekhiF. и BahadoriM. H. (2018)

наблюдается значительная разница в распределении генотипов полиморфного варианта гена *PON1 Q192R* между бесплодными пациентами и контрольной группой ($p = 0,001$). Их результаты показали, что пациенты с вариантом *QR* имели низкий риск идиопатического мужского бесплодия ($OR=0,49$, $95\%CI=0,33-0,73$, $p=0,0004$), а аллель *R* может оказывать протективное действие на предрасположенность к идиопатическому мужскому бесплодию ($OR=0,31$, $95\%CI=0,21-0,47$, $p=0,0001$) (Behrouzi S., Mashayekhi F., Bahadori M. H., 2018). Большинство работ «случай-контроль», несмотря на изучение различных генов, посвящена анализу генов антиоксидантных ферментов и ферментов системы репарации ДНК без оценки возможных межгенных взаимодействий (Tavilani H. et al., 2014; Sabouhi S. et al., 2015; Song P. et al., 2015; Ivanovna M. G., 2019; Xu P. et al., 2020; Mousavi-Nasab F. S., Colagar A. H., 2020).

Как в реакциях окислительного стресса, так и в механизмах антиоксидантной защиты клетки от действия АФК непосредственное участие может принимать оксид азота. В организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинин в ходе реакции, катализируемой NO-синтазой (NOS). В настоящее время идентифицированы три изоформы NOS: NOS1 - нейрональная (nNOS); NOS2 – индуцибельная или макрофагальная (iNOS); NOS3 – эндотелиальная (eNOS). Оксид азота является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов (Nasr H. B. et al., 2016).

Идиопатическое мужское бесплодие может быть обусловлено как свободно-радикальными процессами, так и неблагоприятными факторами окружающей среды, генетическими и эпигенетическими отклонениями (Krausz C. et al., 2022; Wyck S. et al., 2018). Обнаружение новых генетических причин мужской инфертильности при идиопатическом бесплодии - одна из первичных задач современной генетики.

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

Выявление взаимоотношений полиморфных локусов генов, участвующих в свободнорадикальных процессах, может определить стратегию персонализированной терапии при патозооспермии. Обнаружение взаимодействия однонуклеотидных полиморфизмов полезно для понимания предрасположенности человека к тем или иным заболеваниям. Целью данного исследования было проведение анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов *PON1(Q192R)*, *SOD1(G7958A)*, *CAT(C262T)*, *NOS3(C786T)* и *hOGG1(Ser326Cys)* при патозооспермии.

Для моделирования межгенных взаимодействий полиморфных локусов генов *PON1*, *SOD1*, *NOS3*, *CAT*, *hOGG1* использовали программное обеспечение MultifactorDimensionalityReduction («MDR», версия 3.0.2, <https://sourceforge.net/projects/mdr>). В программе MDR выбирается статистически значимая модель взаимодействия генов, которая позволяет с более высокой точностью и с наименьшей ошибкой определить повышенный или пониженный риск развития заболевания для пациента (Пономаренко И.В., 2019). Оптимальной считается модель с воспроизводимостью не менее 9 из 10 и диагностической эффективностью не менее 70%. В процессе моделирования были использованы следующие настройки поиска: количество атрибутов (attribute count range) — от 1 до n (где n - количество анализируемых факторов); воспроизводимость модели (cross-validation count) — 100; анализ топ-моделей (track top models) — 1000; классификация ячеек (ambiguous cell assignment) — неклассифицированные (unclassified); конфигурация метода поиска (search method configuration) — всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) — точный тест Фишера (Fisher's exact test); (Савикина К. Г., 2021).

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 (CrossValidationconsistency) и 78%-ной точностью предсказания (testing balanced accuracy). Чувствительность модели (Se) составила – 0,7342, специфичность (Sp) – 0,8163. Данные представлены в таблице 3.4.1.

Таблица 3.4.1.

Модели межгенных взаимодействий *PON1Q192R*, *SOD1G7958A*, *CAT C-262T*, *NOS3 C-786T* и *hOGG1Ser326Cys* при патозооспермии.

Model	Bal. Acc. CV Testing	CV Consistency
<i>SOD1</i>	0,3524	5/10
<i>PON1, NOS3</i>	0,3872	4/10
<i>CAT, PON1, hOGG1</i>	0,5283	7/10
<i>CAT, PON, NOS3, hOGG1</i>	0,5481	7/10
<i>SOD1, CAT, PON, NOS3, hOGG1</i>	0,7820	10/10

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 3.4.1) (Савикина К.Г., 2021)

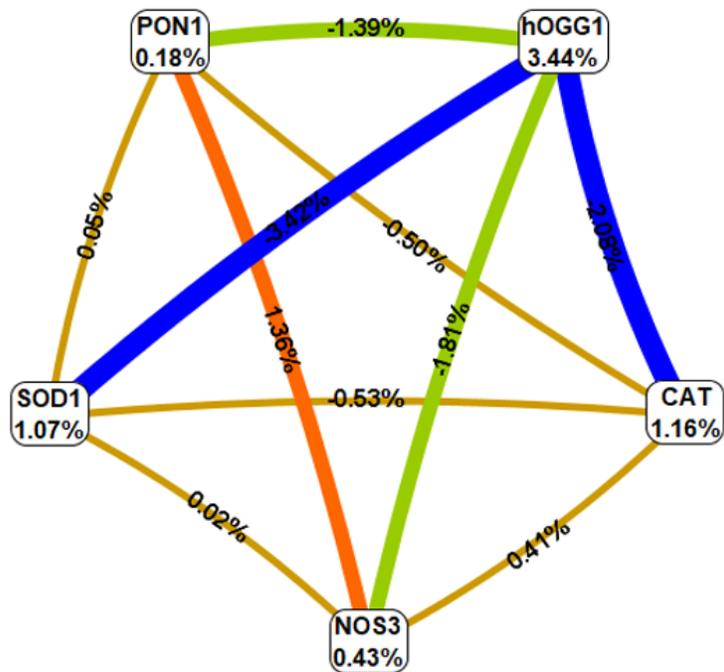


Рисунок 3.4.1. Схема Фрюхтерман-Рейнгольда межгенных взаимодействий *PON1* (*Q192R*), *SOD1* (*G7958A*), *CAT* (*C262T*), *NOS3* (*C786T*) и *hOGG1* (*Ser326Cys*) у мужчин с патозооспермией.

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 (Савикина К.Г., 2021). Согласно схеме Фрюхтерман-Рейнгольда, из пяти анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладают полиморфные варианты *hOGG1 Ser326Cys* (3,44%), *CATC262T* (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 (Савикина К.Г., 2021).

Таким образом, анализ межгенных взаимодействий позволил выявить ключевые ген-генные взаимодействия, которые могут приводить к нарушению процессов сперматогенеза и развитию патозооспермии в популяции мужчин Ростовской области.

Глава 3.5. Мультифакторный анализ изучения взаимосвязей между генотипом, окислительным стрессом и гормональный фоном у пациентов с патозооспермией.

Анализ биохимических и генетических параметров их взаимосвязей и изменений в процессе сперматогенеза был выполнен с помощью мультифакторного анализа (Multiple factor analysis (MFA) (PagèsJ., 2014).

Как видно из представленных результатов (рис 3.5.1-3.5.3) Гормональный фон в периферической крови и интенсивность свободно-радикальных процессов в семенной плазме у мужчин являются более значимыми факторами для оценки фертильности при нормоспермии. При патоспермии (олигоспермии и астенозооспермии) 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. Из представленных данных видно, что при нормо- и олигозооспермии координаты «активной» группы «Гормоны» по первой оси почти совпадают, что означает, что их вклад в первое измерение почти одинаков. 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.

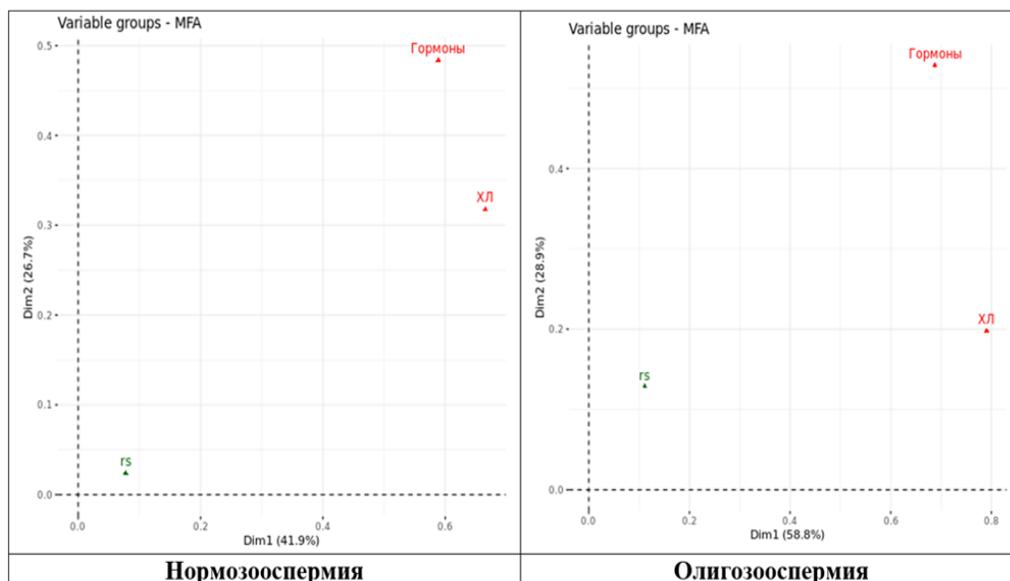


Рис. 3.5.1. Результаты мультифакторного анализа представления качества групп количественных переменных на карте факторов в норме и при олигозооспермии.

Примечание: rs - все исследуемые полиморфные варианты генов. ХЛ - все исследуемые параметры интенсивности свободно-радикальных процессов; Гормоны – все изученные гормоны

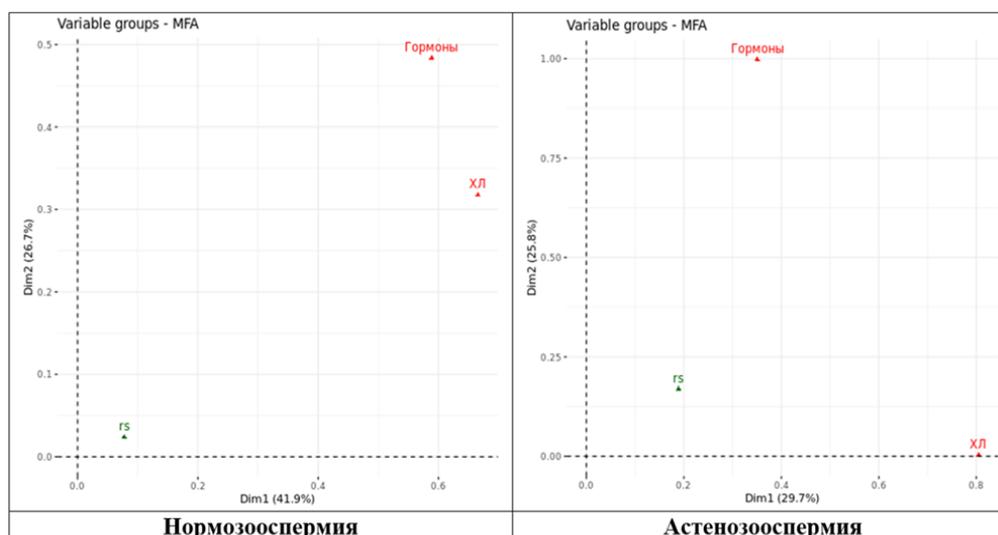


Рис. 3.5.2. Результаты мультифакторного анализа представления качества групп количественных переменных на карте факторов в норме и при астенозооспермии.

Примечание: rs - все исследуемые полиморфные варианты генов. ХЛ - все исследуемые параметры интенсивности свободно-радикальных процессов; Гормоны – все изученные гормоны.

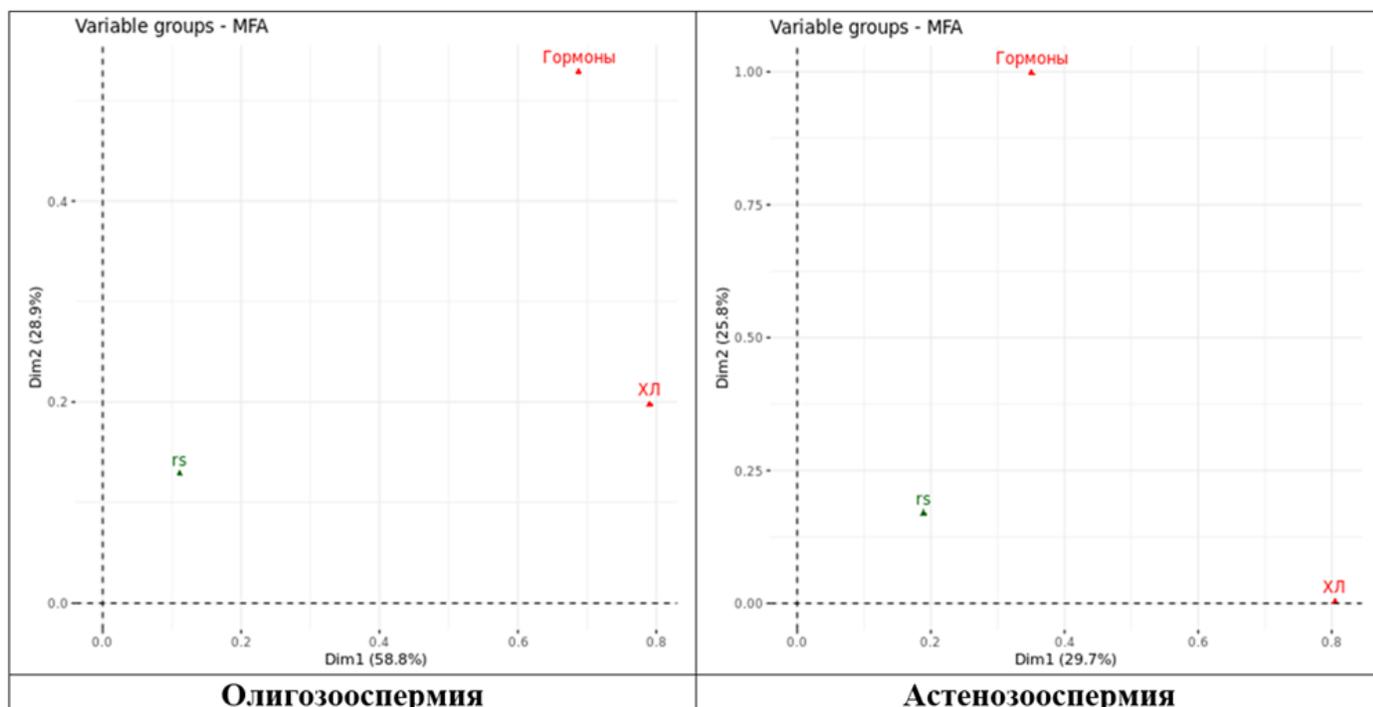


Рис. 3.5.3. Результаты мультифакторного анализа представления качества групп количественных переменных на карте факторов в норме и при астенозооспермии. Примечание: rs - все исследуемые полиморфные варианты генов. ХЛ - все исследуемые параметры интенсивности свободно-радикальных процессов; Гормоны – все изученные гормоны.

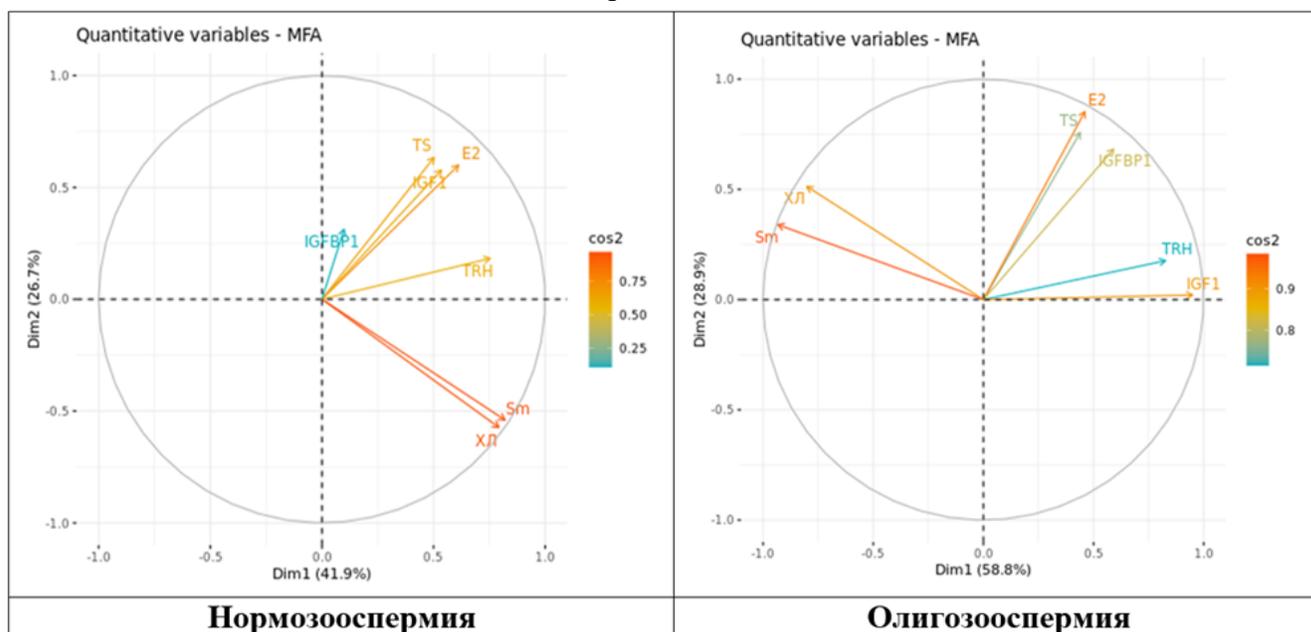


Рис 3.5.4. Представление вклада и направленности отдельных показателей главных компонент (РСА), когда переменные являются количественными. Примечание: E2 –эстрадиол; TS -тестостерон, TRH – тиреотропин-рилизинг-гормон, IGF1 - инсулиноподобный фактор роста 1, IGFBP1 - белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста.

На рисунках 3.5.4 – 3.5.6 оценен вклад каждого показателя из группы «гормоны» и группы «ХЛ». Направление показателей гормонального фона при нормо- и патозооспермии имеют одинаковую инерцию. Любое направление подпространства, порожденного этими шестью переменными отражающих содержание гормонов, имеет одинаковую направленность. 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. При олигозооспермии изменение интенсивности свободно-радикальных процессов (ХЛ) и емкости антиоксидантных систем (S_m) меняет свою инерцию в отрицательную сторону. Ядро MFA основано на факторном анализе (РСА в случае количественных переменных, МСА в случае качественных переменных), в котором переменные взвешиваются. Эти веса одинаковы для переменных одной и той же группы (и варьируются от одной группы к другой). Как видно из представленных результатов направление показателей гормонального фона при нормо- и патоспермии имеют одинаковую инерцию. Однако, содержание IGF1 при олигоспермии 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 плазме крови мужчин большой вклад в значимый показатель для оценки олигоспермии, при астенозооспермии большой вклад в группу «Гормоны» оказывает изменчивость тестостерона и белок-1, связывающий инсулиноподобного фактора роста.

Ранее было показано, что у крыс эндокринный фон влияет на мужскую фертильность через поколения (Anway M.D., Cupp A.S., et al., 2005). Механизм такого наследования описывают в том числе через действие некодирующих РНК (Liebers R. et al., 2014), которое вызывает наследственные колебания генной активности, происходящие без изменений в последовательности ДНК при передаче сценария регуляции работы генов дочерним организмам. С

накоплением информации о результатах исследования эпигенетических событий в гаметогенезе становится очевидным, что эпигенетические механизмы регулируют многие ключевые функции, обеспечивающие стабильность генома, наследуемость изменений в генной экспрессии. Эпигенетическая «пластичность» хромосом при прохождении митоза и мейоза необходима для компенсации происходящих изменений нуклеотидной последовательности и хромосомных перестроек, которые связаны с видообразованием (Курило Л.Ф, Штаут М. И., 2015). Для некоторых этапов сперматогенеза, эмбриогенеза описаны события с влиянием или еще только предполагаемым влиянием эпигенетических факторов.

При олигоспермии изменение интенсивности свободнорадикальных процессов (ХЛ) и емкости антиоксидантных систем (Sm) меняет свою инерцию в отрицательную сторону.

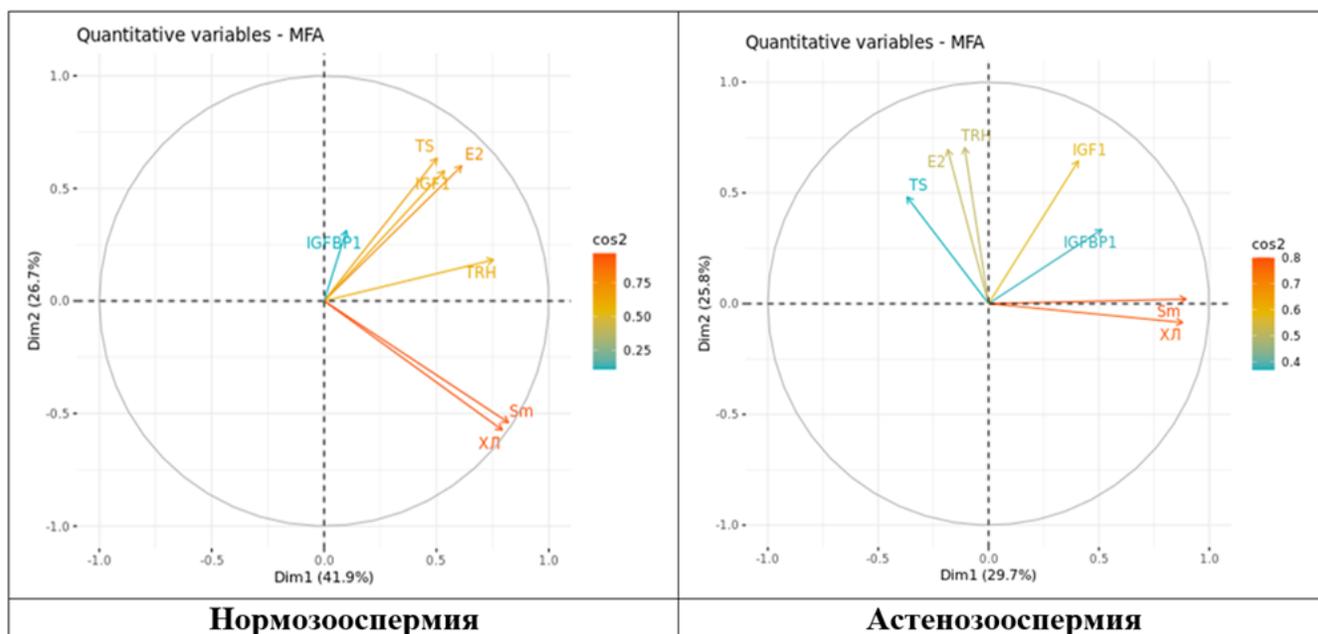


Рис 3.5.5. Представление вклада и направленности отдельных показателей главных компонент (PCA), когда переменные являются количественными.

Примечание: E2 –эстрадиол; TS -тестостерон, TRH – тиреотропин-рилизинг-гормон, IGF1 - инсулиноподобный фактор роста 1, IGFBP1 - белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста.

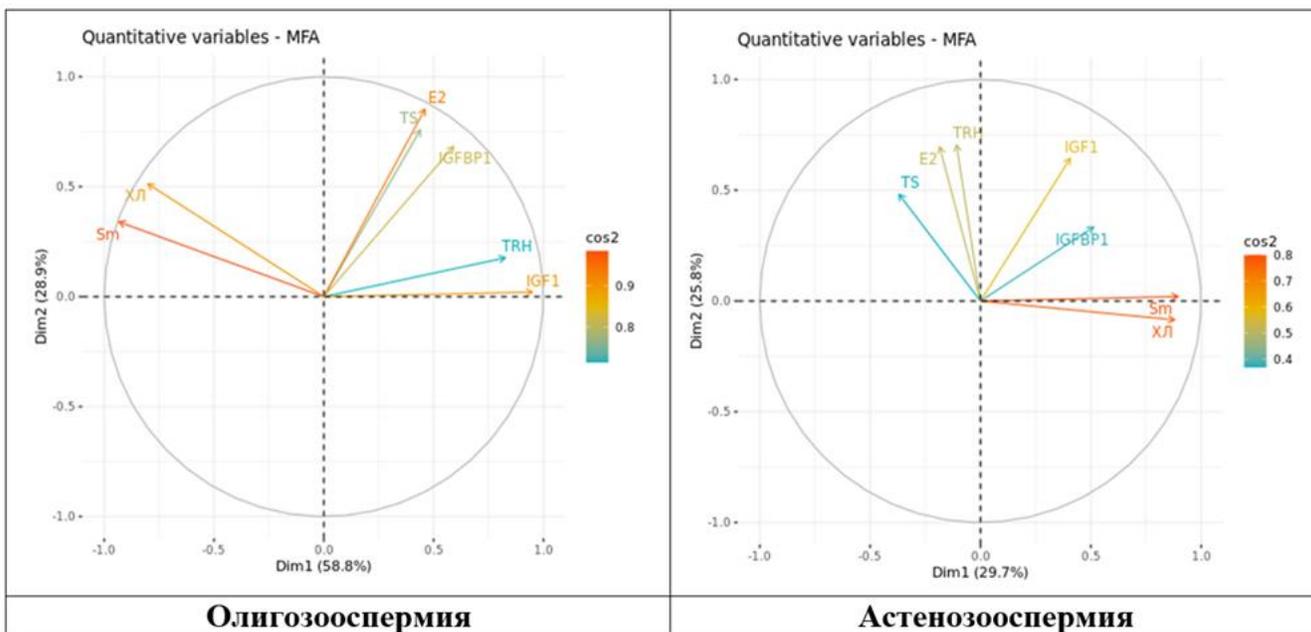


Рис 3.5.6. Представление вклада и направленности отдельных показателей главных компонент (PCA), когда переменные являются количественными.

Примечание: E2 –эстрадиол; TS -тестостерон, TRH – тиреотропин-рилизинг-гормон, IGF1 - инсулиноподобный фактор роста 1, IGFBP1 - белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста.

Проведенный нами мультифакторный анализ также позволил вывить индивидуальные (персонифицированные) группы среди пациентов с мужским бесплодием, которые имели одинаковое сочетание полиморфных локусов в исследуемых генах (рис.3.5.6-3.5.8).

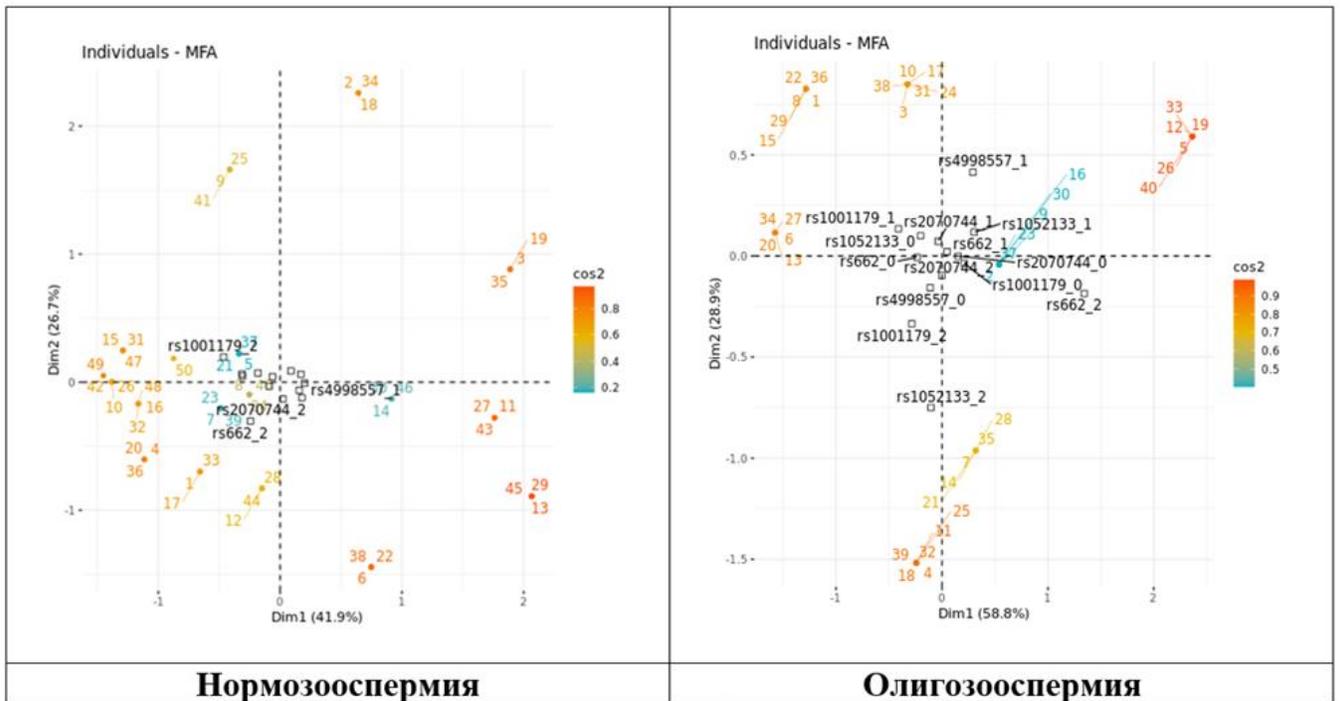


Рис 3.5.6. Индивидуальные (персонифицированные) группы среди пациентов с мужским бесплодием, которые имели одинаковое сочетание полиморфных локусов в исследуемых генах.

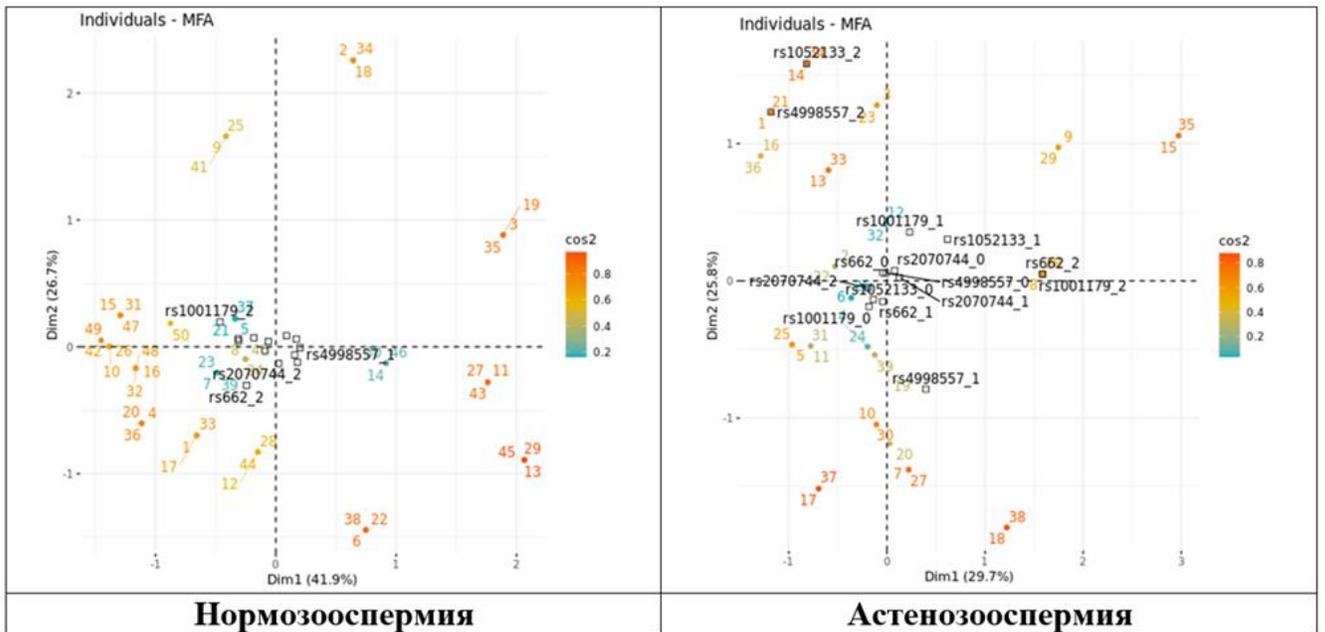


Рис 3.5.7. Индивидуальные (персонифицированные) группы среди пациентов с мужским бесплодием, которые имели одинаковое сочетание полиморфных локусов в исследуемых генах.

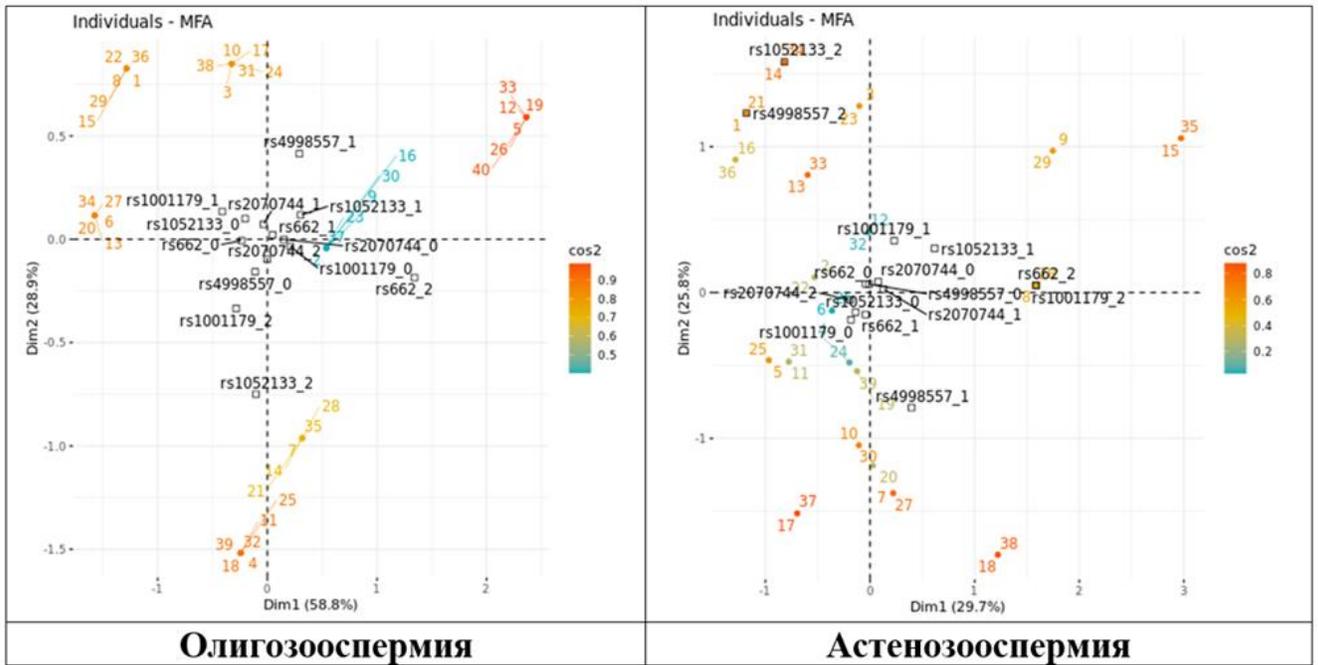


Рис 3.5.8. Индивидуальные (персонифицированные) группы среди пациентов с мужским бесплодием, которые имели одинаковое сочетание полиморфных локусов в исследуемых генах.

При астенозооспермии полиморфизмы rs622_2 по первой оси и rs1052133_2 и rs4998557_2 – по второй оси имеют высокие координаты и показывают корреляцию с этими осями.

Факторный анализ позволил определить формирующиеся функциональные системы, оценить их участие в развитии патологического процесса и выявить взаимосвязи между изучаемыми показателями.

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По оценкам некоторых исследователей, в сперматогенез вовлечено более 2000 генов, контролирующих процессы пролиферации гоноцитов и сперматогониев, мейотического деления и спермиогенеза (Hargreave Т.В., 2000).

Современные исследования показали повышение уровня АФК в репродуктивной системе бесплодных мужчин. Окислительный стресс в мочеполовой системе может вызвать повреждение сперматозоидов, что приводит к уменьшению их подвижности, перекисному окислению липидов, увеличению

фрагментации ДНК и снижению оплодотворяющей способности сперматозоида. Дисбаланс между продукцией АФК и емкостью антиоксидантной системы может привести к окислительному стрессу с последующими побочными эффектами в отношении физиологических процессов, в том числе, гормонального статуса спермальной жидкости. Однако, следует подчеркнуть двойственную природу АФК, которые являются вторичными месенджерами, участвующими в редокс-сигнализации. С другой стороны, при избыточной генерации АФК проявляют себя в качестве повреждающих интермедиатов, инициирующих каскады патологических реакций. АФК оказывают значительное воздействие на сперматогенез и функционирование сперматозоидов. Супрафизиологические уровни АФК могут влиять на все параметры эякулята. Чрезмерное количество АФК приводит к негативным последствиям для качества спермы, но их физиологические уровни необходимы для созревания, гиперактивации и акросомальной реакции, капацитации и хемотаксиса сперматозоидов. В нормальных физиологических условиях, антиоксиданты помогают поддерживать низкий уровень окислительного стресса - эустресс - в сперме.

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 (табл. 4.1). 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.

Это согласуется с исследованием (Desai N. et al., 2009), которое показало, что интенсивность люминол-зависимой ХЛ спермы является информативным маркером и позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать мужское бесплодие, что подтверждено ROC-анализом.

Известно, что люминол-зависимая ХЛ является интегральным методом, позволяющим идентифицировать в биологической среде такие АФК, как гидроксильный ($\text{OH}\cdot$), супероксидный ($\text{O}_2^{\cdot-}$) радикалы, пероксид водорода (H_2O_2), а также гипохлорит (HOCl), относящийся к активным формам галогенов (АФГ) (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., 2009).

Возникает вопрос, каковы источники достаточно широкого спектра активированных кислородных метаболитов (АКМ), образующихся в репродуктивной системе при мужском бесплодии. Как показано на рис. 4.1, окислительный стресс при мужской инфертильности развивается вследствие действия эндогенных и экзогенных факторов (Aitken R.J. et al., 2022; Evans E.P.P. et al., 2021).

Можно полагать, что к важнейшими источникам АКМ, которые обуславливают повышение интенсивности свободно-радикального окисления в эякуляте при патозооспермии, показанное в нашей работе, следует отнести следующие факторы:

- лейкоцитоспермию, которая создает мощный прооксидантный потенциал эякулята и развивается вследствие поступления лейкоцитов (50-60%) и макрофагов (20-30%) в семенную жидкость из предстательной железы и семенных пузырьков. При воспалении эти клетки генерируют в 100 раз больше АФК, чем в норме.

- нарушение электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, которые в большом количестве содержатся в сперматозоидах, что приводит к повышенной утечке электронов и образованию АФК;
- активацию в мужских половых клетках прооксидантных ферментов - НАДФН-оксидазы (NOX5) и оксидазы L-аминокислот, которые осуществляют одно- и двухэлектронное восстановление молекулярного O_2 с образованием супероксида и перекиси водорода. В свою очередь, перекись водорода при восстановлении двухвалентным железом (Fe^{2+}) в реакции Фентона, порождает гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), обладающий наибольшим цито- и генотоксическим потенциалом;
- повышенную экспрессию и активацию в сперматозоидах инфертильных мужчин инудцибельной изоформы NO-синтазы - iNOS, которая, в отличие от конститутивных форм (eNOS, nNOS), продуцирует высокие концентрации NO и других активных форм азота (Fafula R.V et al., 2018; Aitken R.J., Baker M.A., 2020). NO, взаимодействуя с супероксидом ($O_2^{\bullet-}$), образует высоко токсичный пероксинитрит ($ONOO^-$), который вследствие протонирования распадается на гидроксильный радикал (OH^{\bullet}) и диоксид азота (NO_2^{\bullet}), значительно усиливающие свободно-радикальное окисление в сперме;
- интенсификацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах сперматозоидов, обогащенных полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), которые являются субстратами ПОЛ, и накопление цитотоксических продуктов, вызывающих окислительное повреждение;
- дисбаланс и недостаточность антиоксидантной системы как семенной плазмы, так и сперматозоидов.

Таблица 4.1.

Интенсивность свободно-радикальных процессов и состояние
гормонального фона при различных типах патозооспермии

Показатели Группы	Олигозоосперми я	Астенозоосперми я	Олигоастенозоо- спермия	Тератозоосперми я
Параметры ЛХЛ				
H	↑ *	↑ *	↑ *	↑
S_m	↑ *	↑ *	↑ *	↑
Гормоны				
Тестостерон (TTST)	↔	↑ *	↑ *	↑ *
Эстрадиол (E2)	↔	↑ *	↑ *	↓
Дигидротестостерон (DHT)	↓	↓	↓	↓
Тиреотропин-рилизинг гормон (TRH)	↓ *	↓ •	↓ *	↔
Инсулиноподобный фактор роста (IGF1)	↓	↑ *	↓ •	↑ *
IGF-связывающий белок 1 (IGFBP1)	↓ •	↓	↓ *	↓ •
Антимюллеров гормон (AMH)	↓	↓	↓	↓

Примечание: В таблице 4.1. показана направленность изменений параметров ГЛХЛ и уровней гормонов в спермальной жидкости при различных видах патозооспермии относительно нормозооспермии: ↑(увеличение), ↓(снижение), ↔ (показатель близок к норме).

*) - достоверность различий относительно нормозооспермии ($p < 0,001 - 0,05$).

•) - тенденция к изменениям относительно контроля ($0,05 < p < 0,1$).

Лейкоциты, представленные в основном нейтрофилами (50-60%), обнаруживаются в эякуляте и содержат мощную систему прооксидантных ферментов - НАДФН-оксидазу, миелопероксидазу (МПО), ксантиноксидазу (КО) и др., обеспечивающую развития окислительного взрыва при активации. Именно нейтрофилы могут вносить существенный вклад в индукцию ОС в эякуляте. Если НАДФН-оксидаза и ксантиноксидаза продуцируют АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), то МПО - источник гипохлорита ($HOCl$), который также определяется методом ГЛХЛ (Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В, 2009). Гипохлорит повреждает

молекулярные мишени путем пероксидации и галогенирования. Кроме того, HOCl посредством взаимодействия с Fe^{2+} (реакция Осипова) образует гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), обладающий наибольшим деструктивным потенциалом (Панасенко О.М. и др., 2013).

Необходимо подчеркнуть, что в условиях развития мужской инфертильности важными источниками АФК в эякуляте становятся сами сперматозоиды вследствие митохондриальной дисфункции, связанной с нарушением работы ЭТЦ внутренней мембраны митохондрий, стимуляции прооксидантных механизмов и активации ПОЛ с образованием разнообразных свободно-радикальных и молекулярных продуктов. В этом отношении наиболее активны электрофильные альдегиды - 4-гидрокси-2-ноненаль (4-ГН), и малоновый диальдегид (МДА), образующие аддукты с белками сперматозоидов, нарушая их структуру и функцию.

Необходимо подчеркнуть, что плазматическая мембрана сперматозоидов чрезвычайно чувствительна к индукции ПОЛ благодаря исключительно высокому содержанию в липидном бислое полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Koppers A.J. et al., 2010), имеющих множественные двойные связи, что способствует инициации цепного процесса ПОЛ. Высокий уровень ПНЖК в плазматической мембране мужских половых клеток обеспечивает оптимальную текучесть липидной фазы, необходимую для эффективного слияния мембран сперматозоида и ооцита при оплодотворении.

Другая причина повышенного образования АФК в ЭТЦ митохондрий обусловлена влиянием эстрогенов, в частности, 17β -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 (4.1). Известно, что 17β -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 E2 увеличивается скорость потока электронов по дыхательной цепи, что способствует сверхпродукции АФК.

К механизмам генерации АФК в сперматозоидах относится также активация прооксидантных ферментов - НАДФН-оксидазы, ее специфической изоформы NOX5, и оксидазы L-аминокислот, которые в физиологических условиях абсолютно необходимы для выполнения функций мужскими гаметами (Houston B. et al., 2015). На клиническую значимость NOX5 указывает высокий уровень ее экспрессии в сперматозоидах пациентов с астенозооспермией и тератозооспермией, что сопровождалось повышенной выработкой $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и окислительным повреждением ДНК (Vatannejad A. et al., 2019).

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 (табл. 4.1), 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 (табл. 4.1).

Как показали наши исследования, в семенной плазме при различных вариантах патозооспермии наблюдаются резкие колебания уровня тестостерона

(TTST), важнейшего гормона мужской репродуктивной системы, играющего ключевую роль в инициации и поддержании сперматогенеза. Полученные результаты свидетельствуют о заметном повышении уровня TTST 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). Повышение уровня ключевого мужского полового гормона указывает на дисбаланс гормонального профиля при мужской инфертильности и может приводить к негативным последствиям для репродуктивной функции, например, снижению выработки спермы, а также снижению подвижности сперматозоидов и нарушению их морфологии.

Следует заметить, что согласно данным ряда исследователей низкий уровень циркулирующего тестостерона обнаруживается у 20–30% мужчин с бесплодием (Пичугова С.В. и др., 2016; Ahmadi S. et al., 2016), однако, введение тестостерона или гонадотропных средств не приводило к улучшению выработки спермы. Тестостерон вместе с другими гормонами может эффективно блокировать сперматогенез (Dohle G.R. et al., 2003). Можно заключить, что как повышение уровня TTST в сперме, так и его понижение неизбежно приводит к негативным последствиям для оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Доказано, что с уровнем тестостерона тесно связано образование таких гормонов как дигидротестостерон (DHT) и эстрадиол (E2). Исходя из полученных нами результатов, уровень DHT имеет наметившуюся тенденцию к снижению при олиго-, астено- и олигоастенозооспермии, хотя достоверных различий относительно нормозооспермии не показано вследствие широкого диапазона колебаний концентрации гормона. Свободный тестостерон способен восстанавливаться до 5 α -дигидротестостерона цитоплазматическим ферментом 5 α -редуктазой. Причем, DHT связывается с андрогенным рецептором с большей аффинностью, чем тестостерон, его андрогенная активность примерно в 5 раз выше, чем у тестостерона (Pietri E. et al., 2016). 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. Основным механизмом образования эстрадиола у мужчин связан с конверсией андрогенов (тестостерон, андростендиол) путем ароматизации с помощью фермента P-450 ароматазы, которая реализуется, в основном, в жировой и мышечной тканях (Устинкина Т.И., 2007). 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).

Гормоны щитовидной железы могут влиять на параметры спермы посредством связывания с неядерными рецепторами, расположенными в цитоплазматической мембране, цитоплазме, митохондриях и цитоскелете сперматозоида, индуцируя синтез цАМФ и высвобождение Ca^{2+} и усиливая подвижность сперматозоидов (Sengupta P., Dutta S., 2018). В целом, нормальная активность щитовидной железы представляется жизненно важной для поддержания мужской фертильности и качества спермы с помощью геномных или негеномных механизмов, либо локального воздействия на клетки Сертоли и Лейдига, либо путем влияния на взаимодействие между классическими эндокринными осями - гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной и гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (Singh R. et al., 2011; Sengupta P., Dutta S., 2018).

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. Полученные нами данные в определенной мере согласуются с исследованием (Fu L. et al., 2021), согласно которому при астенозооспермии в семенной плазме наблюдались более высокие уровни IGF1, IGF2, IGFBP-2, чем при олигозооспермии и нормозооспермии. При этом количество сперматозоидов положительно коррелировало с уровнем IGF1, IGF2 и IGFBP-2, а подвижность половых клеток - отрицательно коррелировала с содержанием IGF2 и IGFBP2.

Известно, что IGF-I стимулирует созревание сперматозоидов, способствует увеличению их подвижности, а также положительно коррелирует с общим количеством мужских половых клеток (Moss J.L. et al., 2013). В частности, в исследовании (Rodríguez J.A.M. et al., 2019) установлено, что применение IGF1 (1,5 МЕ ежедневно, в течение 2 месяцев) заметно улучшало параметры качества спермы при олигоастенотератозооспермии. В соответствии 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 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.

Поддержание оптимального редокс-гомеостаза мужской репродуктивной системы и стабильность генома в большой степени зависят от функционирования генов, регулирующих развитие окислительного стресса и репарацию ДНК. 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. Фермент hOGG1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой/β-лиазой и способен расщеплять N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного 8-оксогуанина, а затем катализировать разрыв 3'-фосфодиэфирной связи (Коваль В.В. и др., 2014). Известно, что каждая клетка человека содержит до 50 тысяч молекул OGG1, которые защищают геномную ДНК от накопления генотоксических продуктов окисления пуринов.

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 Ser326Cy*. 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 лечение мужского бесплодия.



Рис. 4.1. Схема возникновения окислительного стресса при патозооспермии.

Таким образом, проведенное комплексное исследование позволило оценить роль нарушения редокс-гомеостаза, гормональной дисфункции в эякуляте и установить роль полиморфных вариантов генов, регулирующих развитие окислительного стресса и репарацию ДНК, в формировании патозооспермии при мужской инфертильности (рис.4.1).

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 роста¹, 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 *NOS3C786TxPON1Arg192Glu* и увеличении интенсивности хемилюминесценции.
5. Многопараметрический анализ взаимосвязей между генотипом, окислительным стрессом и гормональным фоном у пациентов с патозооспермией

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdulkareem D. T., Alajeely M. H. J., Mohammad E. J. Correlation between serum anti-müllerian hormone AMH and total testosterone for those with infertile Iraqi men. – 2020.
2. Agarwal A. et al. A schematic overview of the current status of male infertility practice //The world journal of men's health. – 2020. – Т. 38. – №. 3. – С. 308.
3. Agarwal A., Sengupta P. Oxidative stress and its association with male infertility //Male infertility. – Springer, Cham, 2020. – С. 57-68.
4. Ahmadi S., Bashiri R., Ghadiri-Anari A., Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review // Int. J. Reprod BioMed. - 2016. - Vol. 14. No 12. - P. 729-736.
5. Aitken R. J., Clarkson J. S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function //Biology of reproduction. – 1989. – Т. 41. – №. 1. – С. 183-197.
6. Aitken R. J. et al. Oxidative stress and male reproductive health //Asian journal of andrology. – 2014. – Т. 16. – №. 1. – С. 31.
7. Aitken R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage //Molecular reproduction and development. – 2017. – Т. 84. – №. 10. – С. 1039-1052.
8. Aitken R.J., Baker M.A. The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis? // Front. Endocrinol. - 2020. - Vol. 11, Article 581838. - P. 1-22.
9. Aitken R. J., Bakos H. W. Should we be measuring DNA damage in human spermatozoa? New light on an old question //Human Reproduction. – 2021.
10. Aitken R. J., Jones K. T., Robertson S. A. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health //Journal of andrology. – 2012. – Т. 33. – №. 6. – С. 1096-1106.

11. Aitken R.J., Roman S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2008. № 1. P.115-124.
12. Aitken R.J., Drevet J.R., Moazamian A., Gharagozloo P. Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms // *Antioxidants*. - 2022. - Vol. 11, 306. - P.1-21.
13. Aksglaede L. et al. Serum concentration of anti-Müllerian hormone is not associated with semen quality // *Andrology*. – 2018. – T. 6. – №. 2. – C. 286-292.
14. Al Zoubi M., Aljabali A. Polymorphisms, antioxidant genes, and cancer // *Cancer*. – Academic Press, 2021. – C. 101-110.
15. Alanazi M. et al. The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism and breast cancer risk in Saudi population // *Pathology & Oncology Research*. – 2017. – T. 23. – №. 3. – C. 525-535.
16. Alharbi K. K. et al. Q192R polymorphism in the PON1 gene and familial hypercholesterolemia in a Saudi population // *Annals of Saudi medicine*. – 2017. – T. 37. – №. 6. – C. 425-432.
17. Alvarez J. G. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity // *Journal of andrology*. – 1987. – T. 8. – №. 5. – C. 338-348.
18. Amjad S. et al. Association between leptin, obesity, hormonal interplay and male infertility // *Andrologia*. – 2019. – T. 51. – №. 1. – C. e13147.
19. Ammar O. et al. Increased sperm DNA fragmentation in infertile men with varicocele: relationship with apoptosis, seminal oxidative stress, and spermatid parameters // *Reproductive Sciences*. – 2021. – T. 28. – №. 3. – C. 909-919.
20. Ammar O., Mehdi M., Muratori M. Teratozoospermia: Its association with sperm DNA defects, apoptotic alterations, and oxidative stress // *Andrology*. – 2020. – T. 8. – №. 5. – C. 1095-1106.

21. Andersen J. M. et al. Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: association with sperm count and sperm motility //Human Reproduction. – 2016. – T. 31. – №. 8. – C. 1662-1667.
22. Anway M. D. et al. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility //science. – 2005. – T. 308. – №. 5727. – C. 1466-1469.
23. Arafa M. et al. Correlation of oxidation–reduction potential with hormones, semen parameters and testicular volume //Andrologia. – 2019. – T. 51. – №. 5. – C. e13258.
24. Arato I. et al. “In vitro” Effect of Different Follicle—Stimulating Hormone Preparations on Sertoli Cells: Toward a Personalized Treatment for Male Infertility //Frontiers in Endocrinology. – 2020. – T. 11. – C. 401.
25. Arslan A. O. et al. Investigation of variants of critically important antioxidant enzyme genes in patients with polycystic ovary syndrome //Experimental Biomedical Research. – 2019. – T. 2. – №. 1. – C. 8-19.
26. Ashiq S., Ashiq K. The Role of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms in Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis //Biochemical Genetics. – 2021. – C. 1-21.
27. Avendaño C., Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? //Journal of andrology. – 2011. – T. 32. – №. 4. – C. 356-363.
28. Barati E., Nikzad H., Karimian M. Oxidative stress and male infertility: Current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2020. – T. 77. – №. 1. – C. 93-113.
29. Barazani Y. et al. Lifestyle, environment, and male reproductive health //Urologic Clinics. – 2014. – T. 41. – №. 1. – C. 55-66.
30. Barbăroșie C., Agarwal A., Henkel R. Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility //Andrologia. – 2020. – C. e13625.

31. Barratt C. L. R. et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities // *Human reproduction update*. – 2017. – T. 23. – №. 6. – C. 660-680.
32. Barreca D. et al. Covalently immobilized catalase on functionalized graphene: Effect on the activity, immobilization efficiency, and tetramer stability // *Biomaterials science*. – 2018. – T. 6. – №. 12. – C. 3231-3240.
33. Baskaran S. et al. Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? // *Andrologia*. – 2021. – T. 53. – №. 1. – C. e13577.
34. Begum R. et al. Molecular hydrogen may enhance the production of testosterone hormone in male infertility through hormone signal modulation and redox balance // *Medical hypotheses*. – 2018. – T. 121. – C. 6-9.
35. Behrouzi S., Mashayekhi F., Bahadori M. H. The Association of PON1 192 Q/R Polymorphism with the Risk of Idiopathic Male Infertility in Northern Iran // *Avicenna journal of medical biotechnology*. – 2018. – T. 10. – №. 4. – C. 253.
36. Benatta M. et al. The impact of nutrition and lifestyle on male fertility // *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. – 2020. – T. 92. – №. 2.
37. Benghuzzi H. A. Reversible Azoospermia after Long Term Sustained Delivery of DHT // *The FASEB Journal*. – 2017. – T. 31. – C. 723.7-723.7.
38. Berger T. et al. Changes in testicular gene expression following reduced estradiol synthesis: A complex pathway to increased porcine Sertoli cell proliferation // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2021. – T. 523. – C. 111099.
39. Bhalla N. Meiosis: Is Spermatogenesis Stress an Opportunity for Evolutionary Innovation? // *Current Biology*. – 2020. – T. 30. – №. 24. – C. R1471-R1473.
40. Bisht S. et al. Oxidative stress and male infertility // *Nature Reviews Urology*. – 2017. – T. 14. – №. 8. – C. 470.

41. Bracke A. et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility // Reproductive biomedicine online. – 2018. – T. 36. – №. 3. – C. 327-339.
42. Bungum M., Bungum L., Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility // Asian journal of andrology. – 2011. – T. 13. – №. 1. – C. 69.
43. Campedelli F. L. et al. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis // Genetics and Molecular Research. – 2017. – T. 16. – №. 2.
44. Cannarella R. et al. Effects of the selective estrogen receptor modulators for the treatment of male infertility: a systematic review and meta-analysis // Expert opinion on pharmacotherapy. – 2019. – T. 20. – №. 12. – C. 1517-1525.
45. Cannarella R. et al. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №. 5. – C. 1728.
46. Cao M. et al. High-level androgen enhances the differentiation of hESCs into male primordial germ cells // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2020. – C. 487-498.
47. Cao Z. et al. Genetic polymorphisms and susceptibility to sudden sensorineural hearing loss: A systematic review // Audiology and Neurotology. – 2019. – T. 24. – №. 1. – C. 8-19.
48. Carrell D. T., Aston K. I. The search for SNPs, CNVs, and epigenetic variants associated with the complex disease of male infertility // Systems biology in reproductive medicine. – 2011. – T. 57. – №. 1-2. – C. 17-26.
49. Chaim I. A., Nagel Z. D. Assessing BER capacity in the human population // The Base Excision Repair Pathway: Molecular Mechanisms and Role in Disease Development and Therapeutic Design. – 2017. – C. 557-607.

- 50.Chang C. et al. Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells //Biology of reproduction. – 2013. – T. 89. – №. 1. – C. 21, 1-16.
- 51.Checa J., Aran J. M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes // Journal of Inflammation Research. – 2020. – T. 13. – C. 1057.
- 52.Chen S. S. S., Chiu L. P. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and male subfertility in Taiwanese patients with varicocele //Andrologia. – 2018. – T. 50. – №. 5. – C. e13007.
- 53.Cheng J. W., Ko E. Y. Genetic Basis of Endocrine Regulation of Spermatogenesis // Genetics of Male Infertility. – Springer, Cham, 2020. – C. 57-71.
- 54.Chianese R., Pierantoni R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality // Antioxidants. – 2021. – T. 10. – №. 1. – C. 92.
- 55.Choubey M. Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I: Novel Insights into the Male Reproductive Health // Growth Disorders and Acromegaly. – IntechOpen, 2020.
- 56.Choy J. T., Eisenberg M. L. Male infertility as a window to health // Fertility and sterility. – 2018. – T. 110. – №. 5. – C. 810-814.
- 57.Cito G. et al. Redox status assessment in infertile patients with non-obstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction: A prospective study //Andrology. – 2020. – T. 8. – №. 2. – C. 364-371. 3.
- 58.Cooke P. S. et al. Estrogens in male physiology //Physiological reviews. – 2017. – T. 97. – №. 3. – C. 995-1043.
- 59.Cornil C. A., de Bournonville C. Dual action of neuro-estrogens in the regulation of male sexual behavior //General and comparative endocrinology. – 2018. – T. 256. – C. 57-62.
- 60.Cosma A. S. et al. The Influence of GPX1 Pro198Leu, CAT C262T and MnSOD Ala16Val Gene Polymorphisms on Susceptibility for Non-Hodgkin Lymphoma

- and Overall Survival Rate at Five Years from Diagnosis //Acta Medica Marisiensis. – 2019. – T. 65. – №. 1. – C. 25-30.
61. Costa F. et al. Influence of Val16Ala-SOD2 polymorphism on sperm quality parameters //Human Fertility. – 2018. – T. 21. – №. 3. – C. 212-219.
62. da Rosa L. A. et al. Role of non-classical effects of testosterone and epitestosterone on AMH balance and testicular development parameters //Molecular and cellular endocrinology. – 2020. – T. 511. – C. 110850.
63. Darbandi M. et al. Reactive oxygen species and male reproductive hormones //Reproductive Biology and Endocrinology. – 2018. – T. 16. – №. 1. – C. 87.
64. Darbandi S., Darbandi M. Lifestyle Modifications on Further Reproductive Problems //Cresco J Reprod Sci. – 2016. – T. 1. – №. 001.
65. Das M. et al. High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2013. – T. 30. – №. 6. – C. 843-848.
66. Datkhile K. D. et al. Polymorphism in Superoxide Dismutase, Catalase Genes and Their Role in Cervical Cancer Susceptibility among Rural Population of Maharashtra: Findings from A Hospital based Case Control Study //Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology. – 2020. – T. 14. – №. 3. – C. 366-371.
67. Deng Z., Xiang H., Gao W. Significant association between paraoxonase 1 rs662 polymorphism and coronary heart disease // Herz. – 2020. – T. 45. – №. 4. – C. 347-355.
68. Desai N., Sharma R., Makker K., Sabanegh E., Agarwa A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men// Fertility and Sterility. - 2009. - Vol.92, №5. - P. 1625-1631.
69. Di Meo S., Reed T.T., Venditti P. et al. Harmful and beneficial role of ROS Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1– 3.
70. Dick B. et al. The Role of Hormones in Male Sexual Function //Current Sexual Health Reports. – 2020. – C. 1-12.

71. Dinçer Y. et al. DNA repair gene OGG1 polymorphism and its relation with oxidative DNA damage in patients with Alzheimer's disease // *Neuroscience letters*. – 2019. – T. 709. – C. 134362.
72. Dohle G.R., Smit E.R., Weber F.A. Androgens and male fertility // *World J. Urol.* - 2003. - Vol. 21. - P. 341–345.
73. Dorostghoal M. et al. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men // *Andrologia*. – 2017. – T. 49. – №. 10. – C. e12762.
74. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility // *Arab Journal of Urology*. – 2018. – T. 16. – №. 1. – C. 10-20.
75. Dutta S. et al. Physiological role of ROS in sperm function // *Male infertility*. – Springer, Cham, 2020. – C. 337-345.
76. Elakkad A. M. et al. T-786C variation in the promoter sequence of human eNOS gene markedly influences its expression level // *Drug discoveries & therapeutics*. – 2017. – T. 11. – №. 4. – C. 193-197.
77. Elbardisi H. et al. Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test // *Andrology*. – 2020. – T. 8. – №. 3. – C. 610-617.
78. El-Shahat A.E., Gabr, A.R. Meki, E.S. Mehana Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract // *International Journal of Morphology*. 2009. Vol. 27, № 3. P. 757-764.
79. Evans E.P.P., Scholten J.T.M., Mzyk A., Reyes-San-Martin C., Llumbet A.E., Hamoh T., Arts E.G.J.M., Schirhagl R., Cantineau A.E.P. Male subfertility and oxidative stress // *Redox Biology*. - 2021. - Vol. 46, 10071. - P. 1-17.
80. Ezzati M. et al. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview // *Cell and tissue banking*. – 2020. – T. 21. – №. 1. – C. 1-15.

81. Fafula R.V., Iefremova U.P., Onufrovykh O.K. et al. ALTERATIONS IN ARGINASE-NO-SYNTHASE SYSTEM OF SPERMATOZOA IN HUMAN SUBJECTS WITH DIFFERENT FERTILITY POTENTIAL // J. Med. Biochem. - 2018. - Vol. 37. - P. 134–140.
82. Fagerberg L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics // Molecular & cellular proteomics. – 2014. – T. 13. – №. 2. – C. 397-406.
83. Fainberg J., Kashanian J. A. Recent advances in understanding and managing male infertility // F1000Research. – 2019. – T. 8
84. Farías J. G. et al. Chronic hypobaric hypoxia diminishes the expression of base excision repair OGG 1 enzymes in spermatozoa // Andrologia. – 2018. – T. 50. – №. 2. – C. e12876.
85. Farmohammadi A. et al. Association of PON1-L55M genetic variation and breast cancer risk: a case-control trial // Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. – 2020. – T. 21. – №. 1. – C. 255.
86. Fatehi D. et al. Reactive oxygenated species (ROS) in male fertility; source, interaction mechanism and antioxidant therapy // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2018. – T. 11. – №. 2. – C. 791-796.
87. Fatima S. et al. Effect of seminal redox status on lipid peroxidation, apoptosis and DNA fragmentation in spermatozoa of infertile Saudi males // Saudi medical journal. – 2020. – T. 41. – №. 3. – C. 238-246.
88. Fattakhov N. S. et al. Pathogenetic significance of C774T single nucleotide polymorphism of the endothelial NO synthase gene in the development of metabolic syndrome // Biomeditsinskaia khimiia. – 2016. – T. 62. – №. 4. – C. 447.
89. Fietz D. et al. Excessive unilateral proliferation of spermatogonia in a patient with non-obstructive azoospermia—adverse effect of clomiphene citrate pre-treatment? // Basic and clinical andrology. – 2020. – T. 30. – №. 1. – C. 1-11.

90. Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility //Pol J Vet Sci. – 2004. – T. 7. – №. 4. – C. 311-321.
91. Fu L., Yuen K.C.J., Tint A.N. et al. Association of decreased sperm motility and increased seminal plasma IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, and PSA levels in infertile men // Endocrine. - 2021. - Vol. 7474. - P. 698-706.
92. Fusco F. et al. Suppression of Spermatogenesis by Exogenous Testosterone //Current Pharmaceutical Design. – 2020.
93. García Rodríguez A. et al. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility //Annals of human genetics. – 2019. – T. 83. – №. 1. – C. 63-72.
94. Garcia-Rodriguez A. et al. CAT-262CT Genotype shows higher catalase activity in seminal plasma and lower risk of male infertility //Meta Gene. – 2018. – T. 18. – C. 16-22.
95. Garcia-Rodriguez A. et al. Impact of polymorphism in DNA repair genes OGG1 and XRCC1 on seminal parameters and human male infertility //Andrologia. – 2018. – T. 50. – №. 10. – C. e13115.
96. Gill-Sharma M. K. Testosterone retention mechanism in Sertoli cells: a biochemical perspective //The open biochemistry journal. – 2018. – T. 12. – C. 10
97. Giwercman A. et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study //International journal of andrology. – 2010. – T. 33. – №. 1. – C. e221-e227.
98. Glorieux C., Calderon P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach // Biological chemistry. – 2017. – T. 398. – №. 10. – C. 1095-1108.
99. Gosalvez J., Tvrda E., Agarwal A. Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2017. – T. 34. – №. 6. – C. 697-707.

100. Guercio G. et al. Estrogens in human male gonadotropin secretion and testicular physiology from infancy to late puberty //Frontiers in endocrinology. – 2020. – T. 11. – C. 72.
101. Gunes S., Sertyel S. Sperm DNA damage and oocyte repair capability //A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage. – Springer, Cham, 2018. – C. 321-346.
102. Hade I. M., Abdul-Hassan I. A. Gene Expression Profile of eNOS Gene in a Sample of Iraqi Asthenozoospermic Patients //Iraqi journal of biotechnology. – 2019. – T. 18. – №. 3.
103. Han R. Y. et al. Correlation of reproductive hormone levels and seminal plasma oxidative stress with semen quality in obese males //Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology. – 2018. – T. 24. – №. 5. – C. 419-424.
104. Hargreave T. B. Genetic basis of male fertility / Hargreave T. B. // Br. Med Bull. — 2000. — Vol. 56, N 3. — P. 650–671.
105. Hayden R. P., Flannigan R., Schlegel P. N. The role of lifestyle in male infertility: diet, physical activity, and body habitus //Current urology reports. – 2018. – T. 19. – №. 7. – C. 1-10.
106. Helli B. et al. Probiotic effects on sperm parameters, oxidative stress index, inflammatory factors and sex hormones in infertile men //Human Fertility. – 2020. – C. 1-9.
107. Heráček J. et al. Serum and intratesticular sex steroids in azoospermic men: how do they correlate? //Physiological research. – 2018. – T. 67. – C. S521-S524.
108. Hernandez A., Martinez M. E. Thyroid hormone action in the developing testis: intergenerational epigenetics //Journal of Endocrinology. – 2020. – T. 244. – №. 3. – C. R33-R46.
109. Hernández-Collazo A. A. et al. Association between rs662 (A> G) and rs854560 (A> T) polymorphisms in PON1 gene and the susceptibility for psoriasis in mestizo population of Western Mexico //Molecular Biology Reports. – 2020. – C. 1-12.

110. Heublein S. et al. Vitamin D receptor, Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor γ are overexpressed in BRCA1 mutated breast cancer and predict prognosis //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2017. – T. 36. – №. 1. – C. 1-11.
111. Homa S. T. et al. A comparison between two assays for measuring seminal oxidative stress and their relationship with sperm DNA fragmentation and semen parameters //Genes. – 2019. – T. 10. – №. 3. – C. 236.
112. Homma T. et al. Heterozygous SOD1 deficiency in mice with an NZW background causes male infertility and an aberrant immune phenotype //Free radical research. – 2019. – T. 53. – №. 11-12. – C. 1060-1072.
113. Houston B., Curry B., Aitken R.J. Human spermatozoa possess an IL4I1 L-amino acid oxidase with a potential role in sperm function // Reproduction. - 2015. - Vol. 149. - P. 587–596.
114. <https://sourceforge.net/projects/mdr>
115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7200>
116. Huang C. et al. Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta-analysis //Oncotarget. – 2018. – T. 9. – №. 36. – C. 24494.
117. Huynh T., Mollard R., Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility //Human Reproduction Update. – 2002. – T. 8. – №. 2. – C. 183-198.
118. Ipsa E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues //Frontiers in endocrinology. – 2019. – T. 10. – C. 777.
119. Ismael Z. K., AL-Anbari L. A., Mossa H. A. L. Relationship of FSH, LH, DHEA and testosterone levels in serum with sperm function parameters in infertile men //Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2017. – T. 9. – №. 11. – C. 2056-2061.
120. Jalilvand A., Karimi N. Impact of polymorphism in DNA repair genes OGG1 and XRCC1 on seminal parameters and human male infertility //Andrologia. – 2020. – C. e13633-e13633.

121. Jameson J.L. Harrison's endocrinology, 4E. New York: McGraw-Hill Education; 2016.
122. Jena S. R. et al. Paternal contributors in recurrent pregnancy loss: Cues from comparative proteome profiling of seminal extracellular vesicles //Molecular reproduction and development. – 2021. – T. 88. – №. 1. – C. 96-112.
123. Ji G. et al. Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population //Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – T. 52. – №. 4. – C. 775-780.
124. Kahraman C. Y. et al. The Relationship between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene (NOS3) Polymorphisms, NOS3 Expression, and Varicocele //Genetic testing and molecular biomarkers. – 2016. – T. 20. – №. 4. – C. 191-196.
125. Kamiński P. et al. External and genetic conditions determining male infertility //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №. 15. – C. 5274.
126. Kang-sheng L. I. U. et al. Application of Anti-Müllerian Hormone in Diagnosis of Male Infertility //Journal of International Translational Medicine. – 2017. – T. 5. – №. 1. – C. 19-22.
127. Karahalil B., Elkama A., Orhan G. Oxidative stress gene polymorphisms may have an impact in the development of ischemic stroke //The journal of gene medicine. – 2017. – T. 19. – №. 3. – C. e2947.
128. Kasman A. M., Del Giudice F., Eisenberg M. L. New insights to guide patient care: the bidirectional relationship between male infertility and male health //Fertility and sterility. – 2020. – T. 113. – №. 3. – C. 469-477.
129. Khosrowbeygi A., Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters //BMC clinical pathology. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 1-6.

130. Kiffmeyer W. R. et al. Genetic polymorphisms in the Hmong population: implications for cancer etiology and survival //Cancer. – 2004. – T. 100. – №. 2. – C. 411-417.
131. Kitoh R. et al. SOD1 gene polymorphisms in sudden sensorineural hearing loss // Acta oto-laryngologica. – 2016. – T. 136. – №. 5. – C. 465-469.
132. Ko E. Y., Sabanegh Jr E. S., Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity //Fertility and sterility. – 2014. – T. 102. – №. 6. – C. 1518-1527.
133. Koppers A.J., Garg M.L., Aitken R.J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa // Free Radic. Biol. Med. - 2010. - Vol. 48. - P. 112–119.
134. Kotwicka M. et al. 17 β -estradiol modifies human spermatozoa mitochondrial function in vitro // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2016. – T. 14. – №. 1. – C. 1-9.
135. Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility //Nature Reviews Urology. – 2018. – T. 15. – №. 6. – C. 369-384.
136. Kruger T. F. et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization //Fertility and sterility. – 1988. – T. 49. – №. 1. – C. 112-117.
137. Kumar A., Sridharn T. B., Rao K. A. Role of seminal plasma proteins in effective zygote formation-A success road to pregnancy //Protein and peptide letters. – 2019. – T. 26. – №. 4. – C. 238-250.
138. Kumar N., Singh A. K. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility //Journal of gynecology obstetrics and human reproduction. – 2018. – T. 47. – №. 10. – C. 565-572.
139. Kumar N., Singh N. K. Emerging role of Novel Seminal Plasma Bio-markers in Male Infertility: A Review //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2020.

140. La Vignera S. et al. Impact of thyroid disease on testicular function //Endocrine. – 2017. – T. 58. – №. 3. – C. 397-407.
141. Larose H. et al. Regulation of meiotic progression by Sertoli-cell androgen signaling //Molecular Biology of the Cell. – 2020. – T. 31. – №. 25. – C. 2841-2862.
142. Laursen R. J. et al. Hormonal stimulation of spermatogenesis: a new way to treat the infertile male with non-obstructive azoospermia? //International urology and nephrology. – 2019. – T. 51. – №. 3. – C. 453-456.
143. Leavy M. et al. Effects of elevated β -estradiol levels on the functional morphology of the testis-new insights //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-11.
144. Lee H.S., Park Y-S., Lee J.S. et al. Serum and seminal plasma insulin-like growth factor-1 in male infertility //Clinical and experimental reproductive medicine. – 2016. – Vol. 43. – №. 2. – P. 97-101.
145. Leisegang K., Dutta S. Do lifestyle practices impede male fertility? //Andrologia. – 2021. – T. 53. – №. 1. – C. e13595.
146. Liebers R., Rassoulzadegan M., Lyko F. Epigenetic regulation by heritable RNA //PLoS genetics. – 2014. – T. 10. – №. 4. – C. e1004296.
147. Liu J. L. et al. Genetic testing in male infertility—reassessing screening thresholds //Current opinion in urology. – 2020. – T. 30. – №. 3. – C. 317-323.
148. Liu-Smith F. Single Nucleotide Polymorphisms in ROS-related Genes in Melanoma Risk. – University of California, Irvine, 2016.
149. López-Torres A. S., Chirinos M. Modulation of human sperm capacitation by progesterone, estradiol, and luteinizing hormone //Reproductive Sciences. – 2017. – T. 24. – №. 2. – C. 193-201.
150. Lotti F., Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility //Nature Reviews Urology. – 2018. – T. 15. – №. 5. – C. 287-307.

151. Luo H. et al. Association between Dietary Zinc and Selenium Intake, Oxidative Stress-Related Gene Polymorphism, and Colorectal Cancer Risk in Chinese Population-A Case-Control Study //Nutrition and Cancer. – 2020. – C. 1-10.
152. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa //American Journal of Physiology-Legacy Content. – 1943. – T. 138. – №. 3. – C. 512-518.
153. Magdi Y. et al. Effect of modifiable lifestyle factors and antioxidant treatment on semen parameters of men with severe oligoasthenoteratozoospermia //Andrologia. – 2017. – T. 49. – №. 7. – C. e12694.
154. Mahbouli S. et al. Exploring the potential impact of nutritionally actionable genetic polymorphisms on idiopathic male infertility: a review of current evidence //Asian Journal of Andrology. – 2021.
155. Mahmoud A. A. et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in relation to XRCC1 rs25487 G/A (Arg399Gln) and OGG1 rs1052133 C/G (Ser326Cys) DNA repair genes polymorphisms in patients with chronic hepatitis C and related hepatocellular carcinoma //Cancer management and research. – 2019. – T. 11. – C. 5343.
156. Mahrooz A. et al. The epigenetic regulation of paraoxonase 1 (PON1) as an important enzyme in HDL function: The missing link between environmental and genetic regulation //Clinical biochemistry. – 2019. – T. 73. – C. 1-10.
157. Mansuri M. S. et al. The catalase gene promoter and 5'-untranslated region variants lead to altered gene expression and enzyme activity in vitiligo //British Journal of Dermatology. – 2017. – T. 177. – №. 6. – C. 1590-1600.
158. Marangell L. B. et al. Effects of intrathecal thyrotropin-releasing hormone (protirelin) in refractory depressed patients //Archives of general psychiatry. – 1997. – T. 54. – №. 3. – C. 214-222.
159. Martínez-Holguín E. et al. Antioxidants to Improve Sperm Quality //Male and Sperm Factors that Maximize IVF Success. – 2020. – T. 106.

160. Marzec-Wróblewska U. et al. Human sperm characteristics with regard to cobalt, chromium, and lead in semen and activity of catalase in seminal plasma //Biological trace element research. – 2019. – T. 188. – №. 2. – C. 251-260.
161. Mattar M. A. M. et al. Polymorphisms of base-excision repair genes and the hepatocarcinogenesis //Gene. – 2018. – T. 675. – C. 62-68.
162. Meseguer M. Antonio Martinez-Conejero J, Muriel L, Pellicer A, Remohı J, Garrido N //The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. Drug Metab Lett. – 2007. – T. 1. – №. 2. – C. 121-126.
163. Meucci E. et al. Total antioxidant capacity in patients with varicoceles //Fertility and sterility. – 2003. – T. 79. – C.1577-1583.
164. Miglani K. et al. OGG1 DNA Repair Gene Polymorphism as a Biomarker of Oxidative and Genotoxic DNA Damage //Iranian Biomedical Journal. – 2021. – T. 25. – №. 1. – C. 47.
165. Moradi M. T., Khazaei M., Khazaei M. The effect of catalase C262T gene polymorphism in susceptibility to ovarian cancer in Kermanshah province, Western Iran //Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2018. – T. 38. – №. 4. – C. 562-566.
166. Mostafa T. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism relationship with semen parameters and oxidative stress in infertile oligoasthenoteratozoospermic men //Urology. – 2015. – T. 85. – №. 5. – C. 1058-1061.
167. Moss J.L., Crosnoe L.E., Kim E.D. Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis // Fertil. Steril. - 2013. - Vol. 99, №7. - P. 1814–1820.
168. Mousavi-Nasab F. S., Colagar A. H. Investigation of the association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-T786C gene polymorphism with the risk of male infertility in an Iranian population //Environmental Science and Pollution Research. – 2020. – T. 27. – №. 18. – C. 22434-22440.

169. Muneer A., Pozzi E., Cakir O. O. The Role of Nitric oxide (NO) Donors in the Treatment of Male Infertility //Current Pharmaceutical Design. – 2020.
170. Myandina G. I., Kulchenko N.G., Alhejoj H. The frequency of polymorphism–262 C>T CAT gene of infertile men in the Moscow region // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14. – №. 3.
171. Nasr H. B. et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians //Obesity research & clinical practice. – 2016. – Т. 10. – №. 4. – С. 465-475.
172. Nassar G. N., Leslie S. W. Physiology, testosterone. – 2018.
173. Negri L. et al. Effect of superoxide dismutase supplementation on sperm DNA fragmentation //Archivio Italiano di Urologia e Andrologia. – 2017. – Т. 89. – №. 3. – С. 212-218.
174. Nenkova G., Petrov L., Alexandrova A. Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm //Balkan medical journal. – 2017. – Т. 34. – №. 4. – С. 343.
175. Nikrodhanond A.A., Ortiga-Carvalho T.M., Shibusawa N. Dominant Role of Thyrotropin-releasing Hormone in the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis // J. Biol. Chem. - 2006. - Vol. 281, №8. - P. 5000-5007.
176. Nilsen J. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress // Front. Neuroendocrinol. - 2008. - Vol. 29. - P. 463–475.
177. Noblanc A., Klaassen A., Robaire B. The Exacerbation of Aging and Oxidative Stress in the Epididymis of Sod1 Null Mice //Antioxidants. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 151.
178. Nowicka-Bauer K. et al. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia //Journal of Physiology and Pharmacology. – 2018. – Т. 69. – №. 3.

179. Nowicka-Bauer K., Nixon B. Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility //Antioxidants. – 2020. – T. 9. – №. 2. – C. 134.
180. O'Flaherty C. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis //Andrology. – 2019. – T. 7. – №. 5. – C. 662-668.
181. Otasevic V. et al. Evaluation of the antioxidative enzymes in the seminal plasma of infertile men: Contribution to classic semen quality analysis // Systems biology in reproductive medicine. – 2019. – T. 65. – №. 5. – C. 343-349.
182. Otasevic V. et al. Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in human male fertility. A crossroad of cellular signaling and pathology //BioFactors. – 2020. – T. 46. – №. 2. – C. 206-219.
183. Pagès J. Multiple factor analysis: General presentation and comparison with STATIS //Visualization and verbalization of data. – 2014. – C. 223-37.
184. Pan X. et al. The association between PON1 (Q192R and L55M) gene polymorphisms and risk of cancer: A meta-analysis based on 43 studies //BioMed research international. – 2019. – T. 2019.
185. Pandravadā S. et al. Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – C. 1-12.
186. Panner Selvam M. K. et al. Protein fingerprinting of seminal plasma reveals dysregulation of exosome-associated proteins in infertile men with unilateral varicocele //The world journal of men's health. – 2019. – T. 37..
187. Patrizio P., Sanguineti F., Sakkas D. Modern andrology: from semen analysis to postgenomic studies of the male gametes //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – T. 1127. – №. 1. – C. 59-63.
188. Peng L. P. et al. Correlation of serum anti-Müllerian hormone with semen parameters //Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology. – 2017. – T. 23. – №. 6. – C. 531-535.

189. Pietri E., Conteduca V., Andreis D. et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment // *Endocrine-Related Cancer*. - 2016. - Vol. 23. - R485–R498.
190. Pourmasumi S., Sabeti P. The effect of free radicals on sperm DNA and antioxidant protective role; an assessment and review // *Reviews in Clinical Medicine*. – 2020. – T. 7. – №. 1. – C. 37-42.
191. Prieto-Bermejo R. et al. Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2018. – T. 37. – №. 1. – C. 1-18.
192. Punab M. et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts // *Human reproduction*. – 2017. – T. 32. – №. 1. – C. 18-31.
193. R. Dias T. et al. Endogenous and exogenous antioxidants as a tool to ameliorate male infertility induced by reactive oxygen species // *Antioxidants & redox signaling*. – 2020. – T. 33. – №. 11. – C. 767-785.
194. Rahali D. et al. Spermatogenesis and steroidogenesis disruption in a model of metabolic syndrome rats // *Archives of Physiology and Biochemistry*. – 2020. – C. 1-11.
195. Ramaniuk V. P. et al. Polymorphism of excision repair genes XPD, XRCC1, and hOGG1 in the population of the republic of Belarus and its impact on carcinogenesis // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2015. – T. 5. – №. 2. – C. 141-154.
196. Rashki Ghaleno L. et al. Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants* 2021, 10, 97. – 2021.
197. Ritchie C., Ko E. Y. Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility // *Andrologia*. – 2021. – T. 53. – №. 1. – C. e13581.

198. Rodriguez S., Gaunt T. R., Day I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies //American journal of epidemiology. – 2009. – T. 169. – №. 4. – C. 505-514.
199. Rodriguez J.A.M., Porchia L.M., Camargo F., López-Bayghen E. The use of insulin-like growth factor 1 improved the parameters of the seminogram in a patient with severe oligoasthenoteratozoospermia // SAGE Open Medical Case Reports. - 2019. - Vol. 7. - P. 1-4.
200. Rolland M. et al. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France // Human Reproduction. – 2012. – T. 28. – №. 2. – C. 462-470.
201. Rubio-Riquelme N. et al. Catalase as a molecular target for male infertility diagnosis and monitoring: An overview //Antioxidants. – 2020. – T. 9. – №. 1. – C. 78.
202. Sabouhi S. et al. Human catalase gene polymorphism (CAT C-262 T) and risk of male infertility //Andrologia. – 2015. – T. 47. – №. 1. – C. 97-101.
203. Sakellariou G. K. et al. Comparison of whole body SOD1 knockout with muscle-specific SOD1 knockout mice reveals a role for nerve redox signaling in regulation of degenerative pathways in skeletal muscle //Antioxidants & redox signaling. – 2018. – T. 28. – №. 4. – C. 275-295.
204. Saleh R. et al. High levels of oxidation–reduction potential in frozen-thawed human semen are significantly correlated with poor post-thaw sperm quality //Andrologia. – 2020. – T. 52. – №. 6. – C. e13608.
205. Sampath H., Lloyd R. S. Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis //DNA repair. – 2019. – T. 81. – C. 102667.
206. Santana I. T. S. et al. Association of PON1, TNF- α and TGF- β gene polymorphisms with prognosis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma //Acta Odontologica Scandinavica. – 2020. – C. 1-8.

207. Scarlata E., O'Flaherty C. Antioxidant enzymes and male fertility: Lessons from knockout models //Antioxidants & redox signaling. – 2020. – T. 32. – №. 8. – C. 569-580.
208. Schlegel P. N. Aromatase inhibitors for male infertility //Fertility and sterility. – 2012. – T. 98. – №. 6. – C. 1359-1362.
209. Sengupta P., Dutta S. Thyroid Disorders and Semen Quality // Biomed. & Pharmacol. J. - 2018. - Vol. 11, №1. - P. 1-10.
210. Sevilla R.A., Moya G.C., Lili G. Serum concentrations of estradiol and testosterone in patients with oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia // Ginecol. Obstet. Mex. - 1991. - Vol. 59. - P. 313 -315.
211. Selvam M. K. P., Sengupta P., Agarwal A. Sperm DNA fragmentation and male infertility //Genetics of male infertility. – Springer, Cham, 2020. – C. 155-172
212. Seow D.C. et al. Profile of the Paraoxonase 1 (PON1) Gene 192Q/R Polymorphism and Clinical Associations among Older Singaporean Chinese with Alzheimer's and Mixed Dementia //Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 43-54.
213. Sharma G. N., Gupta G., Sharma P. A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments //Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression. – 2018. – T. 28. – №. 2.
214. Sharma P. et al. Epigenetics and oxidative stress: A twin-edged sword in spermatogenesis //Andrologia. – 2019. – T. 51. – №. 11. – C. e13432.
215. Sharma R. et al. Negative effects of oxidative stress (OS) on reproductive system at cellular level //Oxidative Stress in Human Reproduction. – Springer, Cham, 2017. – C. 65-87. Cham, 2017. - C. 65-87.
216. Sharma R., Agarwal A. Oxidative stress measurement in semen and seminal plasma // Male Infertility. – Springer, Cham, 2020. – C. 69-97.
217. Sheikh A. Thyroid imbalance and subfertility //Subfertility. – Content Repository Only!, 2021. – C. 147-163.

218. Shi Y., Xu W., Zhang X. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with gynecologic cancer susceptibility: a meta-analysis //Bioscience Reports. – 2020. – T. 40. – №. 12.
219. Showell M. G. et al. Antioxidants for male subfertility //Cochrane database of systematic reviews. – 2014. – №. 12.
220. Shrikhande L., Shrikhande B., Shrikhande A. AMH and Its Clinical Implications //The Journal of Obstetrics and Gynecology of India. – 2020. – C. 1-5.
221. Shunmoogam N., Naidoo P., Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance //Vascular health and risk management. – 2018. – T. 14. – C. 137.
222. Singh R., Hamada A.J., Agarwal A. Thyroid Hormones in Male Reproduction and Fertility // The Open Reproduct. Sci. J. - 2011. - Vol. 3. - P. 98-104.
223. Siva Kumar T., Neeraja P. Factors Associated With Oxidative Stress in the Testes and the Mitigating Role of Antioxidants: A Review //Intern. Jour. Recent Innov. Medicine and Clinical Research. – 2019. – T. 1. – №. 1. – C. 6-12.
224. Smith T. B. et al. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1 //Journal of cell science. – 2013. – T. 126. – №. 6. – C. 1488-1497.
225. Song P. et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis //Biology of reproduction. – 2015. – T. 92. – №. 2. – C. 38, 1-9.
226. Staicu F. D., Matas Parra C. Nitric oxide: key features in spermatozoa //Nitric Oxide Synthase-Simple Enzyme-Complex Roles. InTech. – 2017. – C. 137-54.
227. Starovlah I. M. et al. Reduced spermatozoa functionality during stress is the consequence of adrenergic-mediated disturbance of mitochondrial dynamics markers //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-14.

228. Stringer J. M. et al. Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – T. 117. – №. 21. – C. 11513-11522.
229. Subramanian V. et al. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility //Clinical and Experimental Reproductive Medicine. – 2018. – T. 45. – №. 2. – C. 88
230. Sullivan L. B., Chandel N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer //Cancer & metabolism. – 2014. – T. 2. – №. 1. – C. 17.
231. Sun T., Chi Q., Wang G. Research Progress of NOS3 Participation in Regulatory Mechanisms of Cardiovascular Diseases // Journal of biomedical engineering. – 2016. – T. 33. – №. 1. – C. 188.
232. Sung J. H. et al. Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis //Genetics and Molecular Research. – 2015. – T. 14. – №. 4. – C. 16508-16520.
233. Swerdloff R. S. et al. Dihydrotestosterone: biochemistry, physiology, and clinical implications of elevated blood levels //Endocrine reviews. – 2017. – T. 38. – №. 3. – C. 220-254.
234. Tavilani H. et al. Genotype and phenotype frequencies of paraoxonase 1 in fertile and infertile men //Systems biology in reproductive medicine. – 2014. – T. 60. – №. 6. – C. 361-366.
235. Totic J., Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration //Nature. – 1946. – T. 158. – №. 4014. – C. 485.
236. Totic J., Walton A. Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival //Biochemical Journal. – 1950. – T. 47. – №. 2. – C. 199.

237. Traish A. M. et al. Do 5 α -reductase inhibitors raise circulating serum testosterone levels? A comprehensive review and meta-analysis to explaining paradoxical results //Sexual medicine reviews. – 2019. – T. 7. – №. 1. – C. 95-114.
238. Vatannejad A., Tavilani H., Sadeghi M.R., Karimi M., Lakpour N., Amanpour S., Shabani Nashtaei M., Doosti M. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men // J. Endocrinol. Investig. - 2019. - Vol. 42. - P. 1181–1189.
239. Vessey W. et al. Baseline levels of seminal reactive oxygen species predict improvements in sperm function following antioxidant therapy in men with infertility //Clinical Endocrinology. – 2021. – T. 94. – №. 1. – C. 102-110..
240. Virginia Corazzi M. D., Ciorba A. Genetic Polymorphisms in Sudden Sensorineural Hearing Loss: An Update.
241. Vitku J., Kolatorova L., Hampl R. Occurrence and reproductive roles of hormones in seminal plasma //Basic and clinical andrology. – 2017. – T. 27. – №. 1. – C. 19.
242. Walczak–Jedrzejska R., Wolski J. K., Slowikowska–Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility //Central European journal of urology. – 2013. – T. 66. – №. 1. – C. 60.
243. Wang R. S. et al. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes //Endocrinology. – 2006. – T. 147. – №. 12. – C. 5624-5633.
244. Wang Y. F. et al. Seminal plasma anti-Müllerian hormone and inhibin B and serum inhibin B in predicting the outcome of routine IVF fertilization //National journal of andrology. – 2017. – T. 23. – №. 11. – C. 991-996
245. Wasilewski T. et al. Biochemistry of infertility //Clinica Chimica Acta. – 2020.
246. Wdowiak A., Bakalczuk S., Bakalczuk G. Decreased activity of superoxide dismutase in the seminal plasma of infertile men correlates with increased sperm

- deoxyribonucleic acid fragmentation during the first hours after sperm donation //Andrology. – 2015. – T. 3. – №. 4. – C. 748-755.
247. Wigner P. et al. Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression //European Psychiatry. – 2018. – T. 48. – №. 1. – C. 38-48.
248. Wiweko B., Utami P. Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility //Basic and clinical andrology. – 2017. – T. 27. – №. 1. – C. 1.
249. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 th ed. WHO (Geneva) - 2010.
250. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. – Cambridge university press, 1999.
251. Wyck S. et al. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development //Epigenetics & chromatin. – 2018. – T. 11. – №. 1. – C. 1-17.
252. Xie D. et al. Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility //Experimental and therapeutic medicine. – 2018. – T. 15. – №. 6. – C. 5173-5176.
253. Xu H. et al. Clinical Applications of Serum Anti-Müllerian Hormone Measurements in Both Males and Females: An Update //The Innovation. – 2021. – C. 100091.
254. Xu P. et al. Genetic polymorphisms of superoxide dismutase 1 are associated with the serum lipid profiles of Han Chinese adults in a sexually dimorphic manner //PloS one. – 2020. – T. 15. – №. 6. – C. e0234716.
255. Yan L. et al. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2014. – T. 31. – №. 5. – C. 549-554.

256. Yang C. H., Chuang L. Y., Lin Y. D. Multiobjective multifactor dimensionality reduction to detect SNP–SNP interactions //Bioinformatics. – 2018. – Т. 34. – №. 13. – С. 2228-2236.
257. Yin Y. et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in antioxidant genes and their gene-gene interactions with risk of male infertility in a Chinese population //Biomedical Reports. – 2020. – Т. 13. – №. 1. – С. 49-54.
258. Zargari M. et al. The common variant Q192R at the paraoxonase 1 (PON1) gene and its activity are responsible for a portion of the altered antioxidant status in type 2 diabetes //Experimental Biology and Medicine. – 2016. – С. 1535370216641786.
259. Zeng W. et al. Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T786C Polymorphism with In-Stent Restenosis in Chinese Han Patients with Coronary Artery Disease Treated with Drug-Eluting Stent //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 1.
260. Zhao C., Yang J., Xu L. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and esophageal cancer risk: a meta-analysis of 1,875 cancer cases and 3,041 controls //Annals of translational medicine. – 2019. – Т. 7. – №. 18.
261. Zirkin B. R., Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation //Biology of reproduction. – 2018. – Т. 99. – №. 1. – С. 101-111.
262. Азарова А. Э. и др. Свободнорадикальные процессы в тканях животных, преадаптированных к окислительному стрессу //Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2005. – №. S3.
263. Ахвледиани Н. Д. и др. Варикоцеле: роль в развитии мужского бесплодия и методики хирургического лечения //Урология. – 2020. – №. 4. – С. 111-118.
264. Божедомов В. А. и др. Репродуктивная андрология сегодня: что следует знать гинекологам-репродуктологам? – 2020

265. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. - С. 341-388.
266. Владимиров Г.К. и др. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной емкости в лекарственном растительном сырье // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 2.
267. Волков А. Н. Полиморфизм супероксиддисмутаза как генетически обусловленный фактор различной реакции клеток на окислительный стресс // ББК 28.080. 1я43 О 641. – 2020. – С. 29.
268. Гамидов С. И. и др. Оксидативный стресс сперматозоидов: клиническое значение и коррекция // Медицинский совет. – 2021. – №. 3. – С. 19-27.
269. Гамидов С. И. и др. Роль антиоксидантных молекул в терапии мужского бесплодия и подготовке мужчины к зачатию ребенка // Медицинский совет. – 2020. – №. 3..
270. Геннадик А. Г., Нелаева А. А. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения // Ожирение и метаболизм. – 2010. – №. 2. – С. 10-15.
271. Герштейн Е.С., Исаева Э.Р., Кушлинский Д.Н. и др. Инсулиноподобные факторы роста ИФР-связывающие белки сыворотки крови у больных опухолями яичников // Вестник ТГУ. - 2014. - Т.19, №6. - С. 1905-1908.
272. Годовалов А. П. и др. Люминолзависимая хемилюминесценция как средство выявления маркеров окислительного стресса // Высокие технологии, определяющие качество жизни. – 2018. – С. 201-203.
273. Гуськов Е. П. и др. Влияние гипербарической оксигенации на соматические и генеративные клетки крыс // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24. – №. 2. – С. 25-29.

274. Емене Ч. П. и др. Полиморфизм генов антиоксидантной системы у больных рожей и их роль в развитии заболевания //Гены и клетки. – 2015. – Т. 10. – №. 4.
275. Ершова О. А., Баирова Т. А. Распространенность полиморфизма-262С/Т гена каталазы (rs1001179) у русских и бурят Восточной Сибири с эссенциальной артериальной гипертензией //Acta Biomedica Scientifica. – 2015. – №. 3 (103).
276. Жадько Д.Д., Степура Т.Л., Бардин А.Р. Встречаемость частот аллелей и генотипов полиморфизма Т786С гена эндотелиальной синтазы азота у мужчин // БКК 28.707 я431 К 44. – 2016. – С. 57.
277. Жигачева И. В., Васильева С. В. Сигнальные функции оксида азота //Содержание Материалов конференции IT+ M&Ec2018. – 2018. – С. 64.
278. Исламова А.О., Ефименко О.А., Татарчук Т.Ф. Antioxidant complex of vitamins and minerals as pregravid preparation of married couple //Reproductive Endocrinology. – 2016. – №. 27. – С. 62-66.
279. Каранинский Е. В. и др. Влияние окислительного стресса на развитие мужского бесплодия //Международный студенческий научный вестник. – 2020. – №. 2. – С. 6-6.
280. Кириленко Е. А., Онопко В. Ф. Окислительный стресс и мужская фертильность: современный взгляд на проблему //Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т. 2. – №. 2 (114).
281. Кириленко Е. А., Онопко В. Ф. Окислительный стресс и мужская фертильность: современный взгляд на проблему //Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т. 2. – №. 2 (114). – С. 102-108.
282. Коваль В.В., Кнорре Д.Г., Федорова О.С. Структурные особенности взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК // Acta naturae. - 2014. - Т.6, №3. - С. 55-70.

283. Колесникова Л.И., Баирова Т.А., Первушина О.А. Гены ферментов антиоксидантной системы // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2013. - Т. 68, №12. - С. 83-88.
284. Колесникова Л. и др. Глутатионзависимые ферменты и глутатион при бесплодии мужчин с различной массой тела//Вестник Российской академии медицинских наук – 2015. - №1.
285. Коршунов М. Н. и др. Структурные нарушения хроматина сперматозоидов. Патологические аспекты. Клиническая значимость //Вестник урологии. – 2021. – Т. 9. – №. 1
286. Кривоносова Е. В., Китова Е. П. Биохимические характеристики ферментов антиоксидантной системы клеток //Международный студенческий научный вестник. – 2020. – №. 2. – С. 136-136.
287. Курило Л.Ф, Штаут М. И. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции, хронология и динамика сперматогенеза у млекопитающих //Андрология и генитальная хирургия. – 2015. – №. 1. – С. 31-40.
288. Кутихин А. Е. и др. Анализ полиморфизмов генов Подобных рецепторов, интерлейкинов и антиоксидантной защиты у пациентов с колоректальным раком и раком желудка // Медицина в Кузбассе. - 2017. - №. 1.
289. Ломтева С. В. и др. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера Ser326Cys гена hOGG1 при патоспермии //Генетика-фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. – 2019. – С. 41-42.
290. Ломтева С.В., Савикина К.Г., Шестель А.Н., Сагамонова К.Ю., Шкурят Т.П. Окислительный стресс и мужская репродуктивная система // Валеология, 2015 - №1, С 59-67.
291. Лысенко В. И. Оксидативный стресс как неспецифический фактор патогенеза органных повреждений (обзор литературы и собственных исследований) //Медицина неотложных состояний. – 2020. – Т. 16. – №. 1.

292. Мартынович Т. В. и др. Полиморфизм генов, ассоциированных с повышенным сердечно-сосудистым риском, и когнитивные функции пациентов с хронической сердечной недостаточностью, и здоровых лиц. Пилотное исследование //Журнал сердечная недостаточность. – 2015. – Т. 16. – №. 2. – С. 93-99.
293. Машкина Е.В. и др. Связь полиморфизма генов антиоксидантов с репродуктивными потерями // Генетика. - 2020. - Т. 56. - С. 354-362.
294. Метелев А. Ю. и др. Прогностическая ценность различных показателей спермы относительно мужской фертильности //Андрология и генитальная хирургия. – 2015. – №. 4. – С. 51-54.
295. Николаев А. А. и др. Свободные радикалы и биоантиоксиданты в репродуктивных процессах (обзор литературы) //Проблемы репродукции. – 2018. – Т. 24. – №. 1. – С. 21-26.
296. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биол. химии. - 2013. - Т.53. - С. 195-244.
297. Пономаренко И. В. Использование метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) и его модификаций для анализа ген-генных и генно-средовых взаимодействий при генетико-эпидемиологических исследованиях (обзор) //Научные результаты биомедицинских исследований. – 2019. – Т. 5. – №. 1.
298. Проскурнина Е. В. и др. Антиоксидантный потенциал семенной жидкости при нормозооспермии и патозооспермии //Андрология и генитальная хирургия. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 14-19.
299. Проскурнина Е.В., Мельников Н.А., Долгих О.А. и др. Антиоксидантный потенциал семенной жидкости при нормозооспермии и патозооспермии //Андрология и генитальная хирургия. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 14-19.

300. Савикина К. Г. и др. Интенсивность свободно-радикальных процессов и уровень тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости мужчин с различными типами патоспермии, персонифицированный подход //Валеология. – 2015. – №. 3. – С. 15-21.
301. Савикина К. Г., Машкина Е. В., Александрова А. А., Шкурат Т. П., Ломтева С. В. Межгенные взаимодействия и вклад полиморфных локусов генов ферментов, принимающих участие в свободнорадикальных процессах при патозооспермии // Медицинская генетика. – 2021. – Т. 20. – №11 (232). – С. 36-44.
302. Содержание тиреотропин-рилизинг-фактора и инсулинподобного фактора роста-1 в семенной жидкости при различных типах патоспермии / Т. П. Шкурат, К. Ю. Сагамонова, К. Г. Савикина, С. В. Ломтева, Л. В. Гутникова, О. В. Лянгасова, А. А. Александрова // Валеология. – 2017. – №. 1. – С. 12-17
303. Солопёкин Н. В., Лавряшина М. Б. Исследование полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков CYP1A1 (ILE462VAL), PON1 (GLN192ARG) в популяциях алтайцев и хакасов //Фундаментальные и прикладные исследования по проблемам гигиены, медицины труда, экологии человека: матер. – 2016. – Т. 51.
304. Устинкина Т.И. Общие вопросы эндокринологии мужской половой системы: структурно-функциональная организация, этиопатогенез и основные формы нарушения половых желез // Проблемы эндокринологии.- 2007. - Т. 6. - С. 34 - 40.
305. Федорова И. Д., Кузнецова Т. В. Генетические факторы мужского бесплодия //Журнал акушерства и женских болезней. – 2007. – Т. 56. – №. 1. – С. 64-72.
306. Хлобыстов В.В. Изучение полимерности ДНП комплекса больших полушарий головного мозга и тестикул крыс при гипероксии и после нее. Украинский биохимический журнал. – 1977. - №.1.- С. 25-31

307. Шкурат Т.П. Генетические последствия действия кислорода и газовых смесей под давлением на животных и человека. Автореферат, 2000г.