

На правах рукописи

Иштулин Артем Федорович

ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМОПЛАЗМЫ
С ПОДВИЖНОСТЬЮ СПЕРМАТОЗОИДОВ
У ПАЦИЕНТОВ С БЕСПЛОДИЕМ

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент **Короткова Наталья Васильевна**

Официальные оппоненты:

Галимов Шамиль Нариманович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биологической химии

Давыдов Вадим Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии Института фармации и медицинской химии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2024 г. в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Мужское бесплодие - актуальная проблема современной медицины и встречается у 7-10% бесплодных пар (Adeoye O. et al., 2018; Serrano C.A.Z., Obando A.C., 2020; Galimov Sh.N. et al., 2021; Agarwal A. et al., 2023; Aitken R., 2023).

Бесплодие, сформированное вследствие варикоцеле, составляет 21-39% (Сорокина Т.М. и др., 2019; Arab D. et al., 2021; Shah R. et al., 2022). Варикоцеле – варикозное изменение вен семенного канатика. Во многих научных публикациях имеются данные об изменении качества спермы (количества, подвижности, морфологии) при данном заболевании (Евдокимов В.В. и др., 2022; Пичугова С.В., 2022).

В 40-70 % случаев причиной бесплодия является хронический простатит. Хронический простатит/синдром хронической тазовой боли (ХП/СХТБ) или простатит категории III - сложное и малоизученное заболевание предстательной железы.

Основной подход к лечению бесплодия включает постановку диагноза и выяснения причины, и с этой целью необходимо проведение биохимических исследований.

В настоящее время в спермоплазме определяются следующие биохимические показатели: фруктоза, лимонная кислота, концентрация цинка, нейтральная α -гликозидаза, акросомальный белок акрозин. Их определение в спермоплазме не дает однозначного ответа о снижении мужской фертильности; в связи с недостатком биохимических маркеров ранней диагностики мужского бесплодия их поиск является актуальным.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) относится к водорастворимым витаминам группы В, не синтезирующимся в организме человека. При недостатке метилкобаламина, коферментной формы витамина В₁₂, нарушается синтез тимидина, входящего в состав ДНК, что приводит к развитию различных патологических состояний и вполне вероятно, к репродуктивным расстройствам.

В настоящее время в научной литературе имеются данные, которые подтверждают взаимосвязь между количеством витамина В₁₂ и качеством спермы, но результаты таких исследований разноречивы и требуют дополнительного более глубокого изучения (Voxmeer J. et al., 2007; Dhillon V. et al., 2007; Gual-Frau J. et al., 2015). При снижении количества витамина В₁₂ развивается гипергомоцистеинемия, которая, предположительно, может оказывать токсическое действие на сперматогенез и, возможно, приводит к нарушению функций репродуктивной системы у мужчин. При анализе литературных источников было выявлено много противоречивых данных по данному вопросу, в связи с чем эта проблема является актуальной в современном обществе, в котором увеличивается процент мужского бесплодия.

Гомоцистеин (Hcy) является провокатором свободных радикалов и приводит к развитию окислительного стресса (ОС) и накоплению окислительно модифицированных белков (ОМБ). Также к ОС может приводить избыток оксида азота, который в большом количестве может превращаться в пероксинитрит, а последний, в свою очередь, приводит к повреждению клетки. И, таким образом, как ОМБ, так и стабильные конечные метаболиты оксида азота, могут явиться маркером состояний, приводящих к снижению мужской фертильности.

Цистеиновые катепсины содержатся в лизосомах и принимают участие во внутриклеточном обмене белков, разрушая внутренние пептидные связи. Предположительно, катепсины В, L и Н, содержатся в акросоме сперматозоидов.

Степень разработанности темы

Данные о взаимосвязи активности лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов В, L, Н) и качества эякулята в литературе практически не встречаются. Активность катепсинов В, L, Н в спермоплазме при нарушении репродуктивной функции у мужчин с хроническим простатитом и варикоцеле не изучалась.

В литературных источниках имеются данные, что снижение количества витамина В₁₂ в плазме крови, может приводить к различным репродуктивным расстройствам у мужчин (Dhillon V. et al., 2007). Но в тоже время эта тема изучена не до конца и не имеет однозначных результатов исследования.

Данные об изменении концентрации гомоцистеина в спермоплазме у мужчин с нарушением репродуктивной функции при ХП/СХТБ и варикоцеле, в литературе практически отсутствуют. Также не встречаются данные о концентрации витамина В₁₂ и гомоцистеина и их взаимосвязи с показателями эякулята при ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (СА) и варикоцеле II и III степени с СА в анамнезе. Эта тема требует более глубокого изучения.

Цель исследования

Оценка влияния особенностей метаболизма витамина В₁₂ и гомоцистеина во взаимосвязи с активностью цистеиновых катепсинов и показателями окислительного стресса на подвижность сперматозоидов у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле, сопровождающихся бесплодием.

Задачи исследования

1. Оценить концентрацию витамина В₁₂ и гомоцистеина в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, ассоциированными с бесплодием.

2. Оценить количество карбонилированных белков и конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, ассоциированными с бесплодием.

3. Изучить активность катепсинов В, L, Н в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, ассоциированными с бесплодием.

4. Оценить взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂, гомоцистеина, карбонилированных белков,

активностью цистеиновых катепсинов (В, L, Н) в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, ассоциированными с бесплодием.

Научная новизна

Впервые исследована активность цистеиновых протеиназ (катепсинов В, L, Н) в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА, а также у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА. Было выявлено снижение активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА, установлена положительная корреляционная взаимосвязь средней силы между активностью цистеиновых катепсинов В, L, Н и подвижностью сперматозоидов. У пациентов с варикоцеле II и III степени с СА, также отмечалось снижение активности цистеиновых катепсинов В, L, Н; была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней силы между активностью цистеиновых катепсинов В, L, Н и подвижностью сперматозоидов в спермоплазме. В ходе работы было обнаружено, что активность цистеиновых катепсинов В, L, Н у пациентов с ХП/СХТБ с СА выше, чем у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА.

В ходе исследования впервые было определено количество витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА. Обнаружено статистически значимое снижение уровня витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА. Также в ходе нашего исследования было обнаружено повышение уровня Нсу в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА. При определении уровня ОМБ спермоплазмы у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА было отмечено нарастание уровня ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белка. Снижение резервно-адаптационного потенциала (РАП) у двух групп пациентов, но у пациентов с варикоцеле II-III степени с СА снижение оказалось более выражено.

Теоретическая и практическая значимость

Представленные в работе данные позволяют установить взаимосвязь между биохимическими показателями спермоплазмы и подвижностью сперматозоидов при ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. Концентрация витамина В₁₂ и гомоцистеина, состояние активности цистеиновых протеиназ, уровень окислительной модификации белков в спермоплазме могут стать основой для использования в качестве диагностики снижения мужской фертильности при таких заболеваниях, как хронический простатит и варикоцеле.

Методология и методы исследования

Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте выполняли на автоматическом спермоанализаторе АФС-500-2, (Россия). Определение цианкобаламина (витамина В₁₂) и Нсу проводили методом конкурентного ИФА с использованием набора фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай). Определение концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота NO (нитритов и нитратов) использовали метод ИФА в модификации В.А. Метельской. Определение окислительной модификации белков в спермоплазме проводили по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. Для оценки устойчивости системы к окислительному воздействию проводили анализ резервно-адаптационного потенциала. Активность катепсинов В, L, Н изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke. Определение концентрации общего белка в спермоплазме осуществляли биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Mindray» (Китай).

Положения, выносимые на защиту

1. Концентрация витамина В₁₂ снижена, уровень гомоцистеина повышен в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой

пациентов, что может быть использовано в качестве дополнительных биохимических маркеров снижения мужской фертильности.

2. Уровень карбонилированных белков в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией повышен; резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы по сравнению с контрольной группой пациентов снижен, уровень конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II-III степени повышен, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

3. Активность лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией снижена по сравнению с контрольной группой пациентов, что может ассоциироваться с нарушением протеолиза и сопряженных процессов при снижении мужской фертильности.

4. Установлены положительные корреляционные взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсинов В, L, Н, концентрацией витамина В₁₂ в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. Выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между концентрацией витамина В₁₂ и гомоцистеина в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные в ходе исследования результаты доложены на конференциях:

1. VII Всероссийская научная конференция молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021)

2. Научно-практическая конференция (69-я годовщина) ГОУ «Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино» с международным участием «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины», посвященная 30-летию Государственной

независимости Республики Таджикистан и «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)» (Душанбе, 2021).

3. 2-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» 2-3 (Санкт-Петербург, 2021).

4. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022).

5. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022).

6. VI Международный молодежный научно-практический форум «Медицина будущего: от разработки до внедрения» (Оренбург, 2022).

7. XXX Международная конференция и дискуссионный научный клуб «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии nt+me'22. New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology». (Крым, Ялта – Гурзуф, 2022).

Апробация работы состоялась 22 июня 2023 года на заседании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; фармацевтической химии.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования, изложенные в диссертации, внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в практику медицинского центра «Гармония», город Рязань.

Личный вклад автора

Формулировка целей и задач, изучение поставленных задач, изложенных в диссертации, анализ научной литературы по данному вопросу, все лабораторные исследования, статистическая обработка полученных результатов, систематизация результатов проводилась автором самостоятельно, при непосредственном участии научного руководителя. Соавторами публикаций являются И.В. Матвеева, С.Л. Иштулина, Е.И. Карпов, И.В. Минаев, П.М. Полякова.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 5 работ в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, из которых 1 – в издании, входящем в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus.

Объем и содержание работы

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, результаты собственных исследований с их обсуждением, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Объем работы изложен на 124 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, проиллюстрирован 44 рисунками. Список литературы включает 242 источника: 82 отечественных и 160 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились пациенты с диагнозом ХП/СХТБ с СА и пациенты с диагнозом варикоцеле II-III степени с СА. В контрольную группу вошли здоровые мужчины с нормозооспермией, сопоставимые по возрасту с исследуемой группой, проходившие исследование спермограммы перед

экстракорпоральным оплодотворением. Включение пациентов в исследование осуществлялось после их добровольного информированного согласия. Все пациенты получали сбалансированное питание, которое обеспечивало нормальное функционирование организма (Таблица1).

Таблица 1 – Характеристика групп пациентов

Группа пациентов	Диагноз	Количество пациентов	Средний возраст пациентов	Средний рост	Средний вес	% курящих пациентов
Группа 1	Доноры	33	27±5	170-180 см	77,7-85 кг	30%
Группа 2	ХП/СХТБ	33	30±3	170-180 см	80-90 кг	38%
Группа 3	Варикоцеле	33	25±6	170-180 см	78-85 кг	35%

Материалом для исследования явилась спермоплазма. Эякулят собирался однократно, методом мастурбации в клинко-диагностической лаборатории ГБУ РО «ГКБ № 8» в одноразовый пластиковый контейнер с крышкой, предназначенный для сбора эякулята.

Исследование спермограммы проводилось в соответствии с руководством ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, 5-е издание, 2012 год. Первый этап исследования включал оценку макроскопических параметров спермы: объем, разжижение, вязкость, цвет, запах, рН, гемоспермия, лейкоспермия. Далее проводилось исследование подвижности сперматозоидов на спермоанализаторе АФС-500-2, Россия.

Для получения спермоплазмы образец спермы, оставшийся после проведения семиологического анализа, центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1000 об/мин. Осадок отделяли и хранили спермоплазму при температуре – 20°С до проведения анализа.

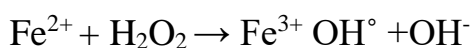
Определение цианкобаламина (витамин В₁₂) и Нсу проводили методом конкурентного ИФА с использованием набора фирмы Cloud-Clone Corp (Китай) для количественного определения витамина В₁₂ и Нсу в любых биологических жидкостях, в том числе в спермоплазме.

Принцип метода. Конкурентная реакция происходит между цианкобаламином (Hcy) меченным биотином, немеченным цианкобаламином (Hcy) (в образцах или контроле) и сорбированными антителами специфичными к цианкобаламину (Hcy).

Оценка интенсивности окислительной модификации белков в спермоплазме проводилась по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой.

В основе метода лежит реакция взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

Оценка металл-катализируемой (индуцированной) окислительной модификации белков в спермоплазме проводилась по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой после инициации окислительных процессов по реакции Фентона:



Резервно-адаптационный потенциал (РАП) – это доля спонтанной ОМБ в металл-катализируемой; при этом уровень индуцированной принимается за 100% (является расчетным показателем). Чем выше разница между спонтанной и индуцированной по реакции Фентона ОМБ, тем выше адаптация к окислительному стрессу.

Определение концентрации стабильных метаболитов NO (нитритов и нитратов) проводили методом ИФА в модификации В.А. Метельской.

Принцип метода: метод определения суммы ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NO}_x$) стабильных метаболитов оксида азота в спермоплазме основан на восстановлении NO_3^- до NO_2^- хлоридом ванадия (III) с последующим определением нитрита с помощью реактива Грисса.

Определение активности катепсинов В, L и Н проводили спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke с измерением

флюоресцирующего продукта реакции 7-амидо-4-метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов: Na-карбобензоксиг-аргинин-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин (Na-CBZ-Arg-Arg-7-амидо-4-метилкумарин), «Sigma», USA) для катепсина В, Na-карбобензоксиг-L-фенилаланил-аргинин-7-амидо-4-метилкумарина (N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, Sigma», USA) для катепсина L, аргинин-7-амидо-4-метилкумарина (Arg-7-амидо-4-метилкумарин, «Sigma», USA) для катепсина Н.

Определение концентрации общего белка в спермоплазме осуществляли биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Mindray» (Китай).

Полученные данные обрабатывались с применением компьютерных программ Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 26.0 (StatSoft Inc., США), работающих в операционной среде «Windows». Нормальность распределения выборки оценивалась по критерию Колмогорова-Смирнова. Для всех значений выборка оказалась непараметрической. Сравнение множества групп проводилось с помощью непараметрического Н-критерия Крускала – Уоллеса. Затем проводили апостериорное множественное сравнение по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Корреляционный анализ проводили в программе Statistica 26.0 с определением коэффициента Спирмена (r). Многофакторный регрессионный анализ проводили в программе Microsoft Office Excel 2016 при помощи пакета анализа MS EXCEL для построения множественной линейной регрессионной модели. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У пациентов с ХП/СХТБ с СА (группа 2) подвижность сперматозоидов была снижена и составила $15 \pm 3\%$, что оказалось статистически значимым по сравнению с контрольной группой, а у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА (группа 3) подвижность сперматозоидов составила $8 \pm 2\%$, что оказалось тоже

статистически значимым по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе подвижность составила $62 \pm 3\%$ (Рисунок 1).

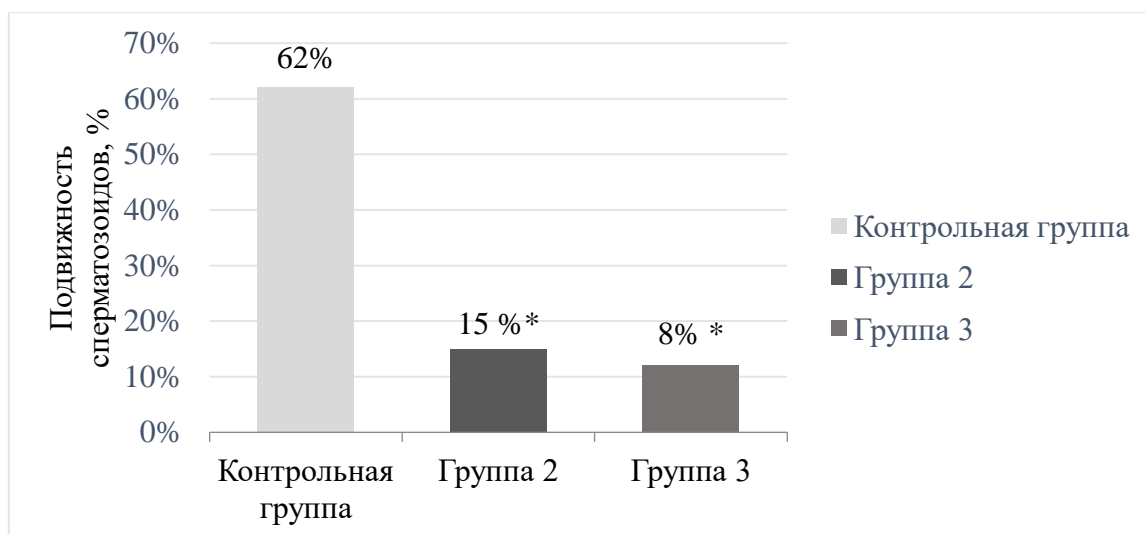


Рисунок 1 – Подвижность сперматозоидов в эякуляте пациентов, %

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

При обработке полученных данных было выявлено статистически значимое снижение концентрации витамина B_{12} в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА (группа 2), которая составила 217,7 пг/мл [91,4;412,0] ($p=0,001$) по сравнению с контрольной группой пациентов (Рисунок 2).

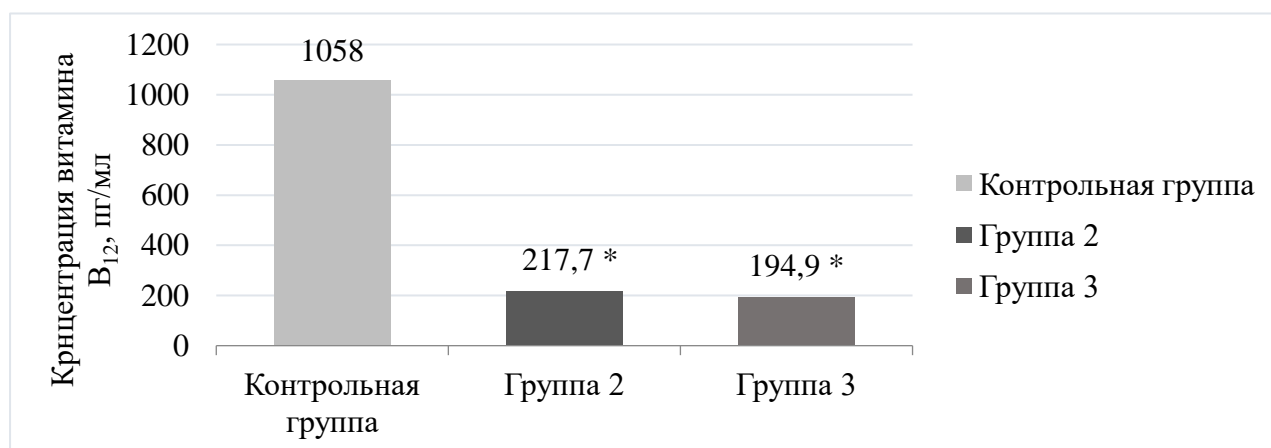


Рисунок 2 – Концентрация витамина B_{12} в спермоплазме пациентов, пг/мл

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

Нами был проведен корреляционный анализ между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина B_{12} в спермоплазме у пациентов с

ХП/СХТБ с СА, при проведении анализа выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности $r=0,690$ ($p=0,001$) между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина B_{12} у пациентов с ХП/СХТБ с СА (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА от концентрации витамина B_{12}

У пациентов с варикоцеле II и III степени с СА (группа 3) также отмечалось снижение концентрации витамина B_{12} в спермоплазме, которая составила $194,9$ [86,4;380,0] пг/мл ($p=0,002$), что в 5,4 раза ниже по сравнению с контрольной группой.

При проведении корреляционного анализа между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина B_{12} у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности ($r=0,687$, $p=0,001$) (Рисунок 4).

При проведении корреляционного анализа у пациентов без нарушения репродуктивной функции была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь высокой степени выраженности ($r=0,792$, $p=0,01$) между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина B_{12} .

Витамин B_{12} участвует в синтезе ДНК, в делении клеток, таким образом, витамин B_{12} необходим для процессов, требующих высокой скорости обновления клеток, таких как клетки крови, слизистых оболочек, эпидермиса.



Рисунок 4 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА от концентрации витамина В₁₂

Можно предположить, что цианкобаламин активирует деление клеток, выстилающих семенные канатики, в результате этого происходит улучшение качества спермы.

При определении концентрации гомоцистеина у пациентов с ХП/СХТБ с СА (группа 2) было выявлено повышение уровня Нсу в спермоплазме, который составил 291,4 нг/мл ($p=0,003$), что в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой. При проведении корреляционного анализа в контрольной группе пациентов была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между подвижностью сперматозоидов и концентрацией Нсу в спермоплазме ($r= -0,535$, $p=0,004$).

Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между концентрацией витамина В₁₂ и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме у обследуемых контрольной группы ($r=-0,468$, $p <0,05$). При проведении корреляционного анализа была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между концентрацией витамина В₁₂ и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА ($r=-0,723$, $p= 0,001$) (Рисунок 5).

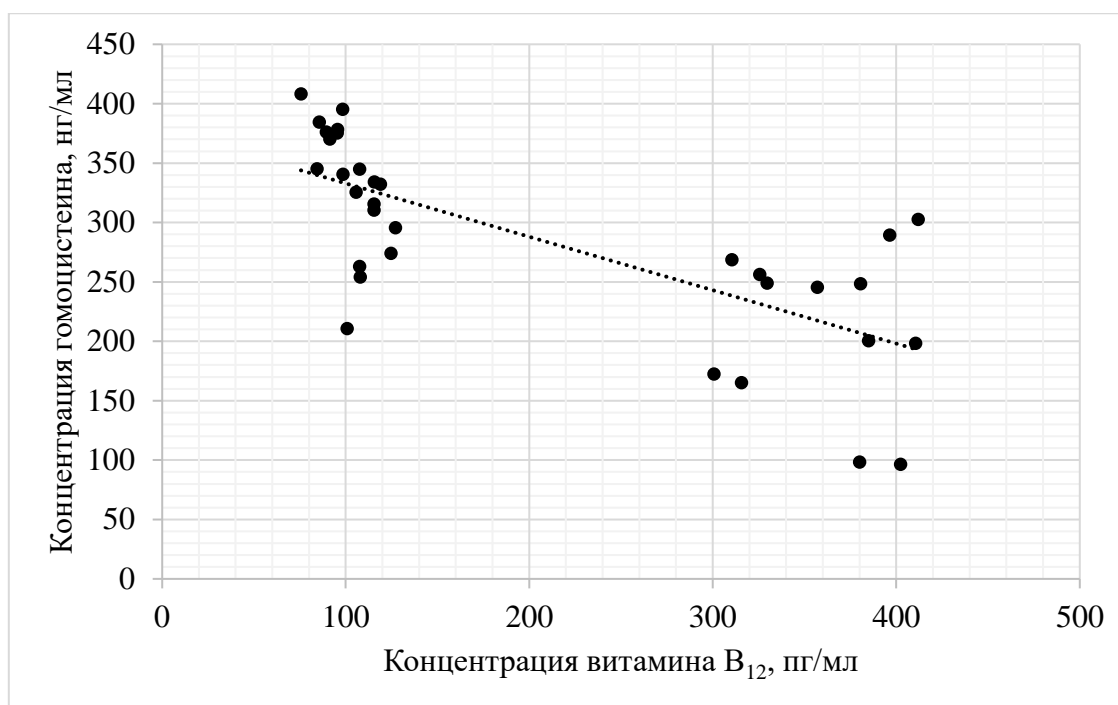


Рисунок 5 – Зависимость концентрации гомоцистеина от концентрации витамина B₁₂ у пациентов с ХП/СХТБ с СА

У пациентов с диагнозом варикоцеле II и III степени с СА (группа 3), также отмечалось повышение в спермоплазме концентрации гомоцистеина в 1,7 раза, которая составила 307,4 нг/мл ($p=0,001$).

При проведении корреляционного анализа у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силой между концентрацией витамина B₁₂ и уровнем гомоцистеина в спермоплазме ($r=-0,755$, $p=0,001$) (Рисунок 6).

Также в этой группе была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между концентрацией гомоцистеина и подвижностью сперматозоидов ($r=-0,728$, $p=0,001$).

При проведении корреляционного анализа в исследуемых группах наблюдалось одинаковая динамика. При снижении концентрации витамина B₁₂ повышается уровень гомоцистеина, а подвижность сперматозоидов снижается.

Мы предполагаем, что повышение уровня гомоцистеина в спермоплазме может быть связано со снижением концентрации витамина B₁₂.

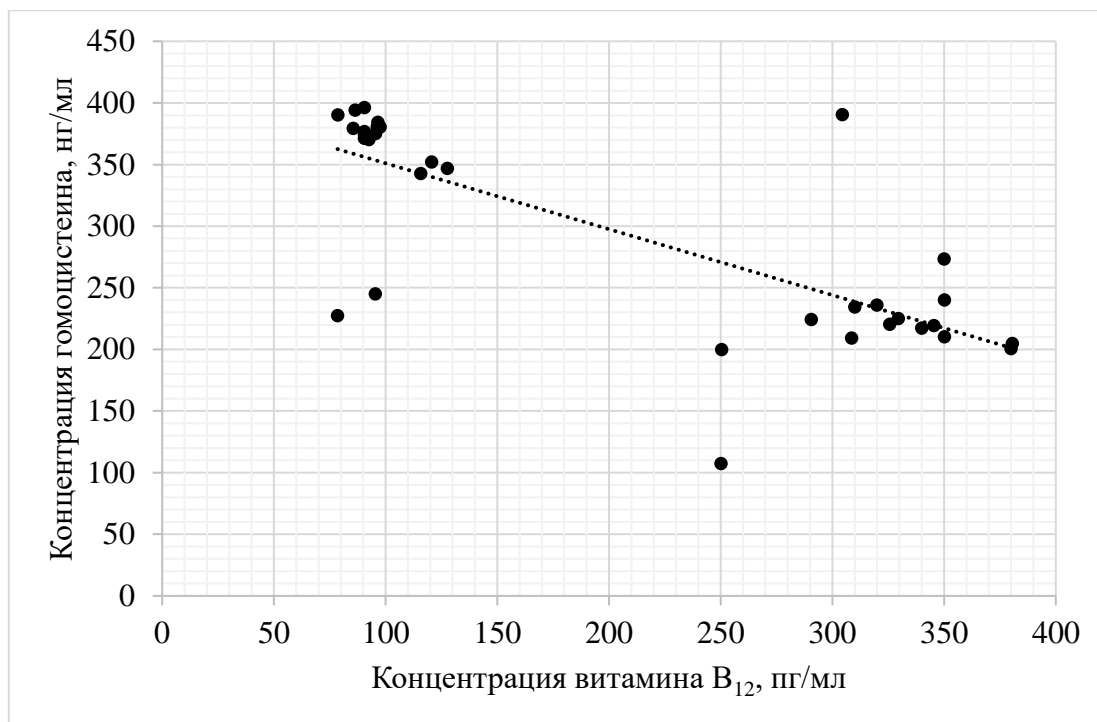


Рисунок 6 – Зависимость концентрации гомоцистеина от концентрации витамина B₁₂ у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА

В спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА было отмечено нарастание альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ), уровень которых является ранним маркером окислительной деструкции белка по сравнению с группой контроля. Также отмечено увеличение и поздних производных окислительной деструкции белка - кетондинитрофенилгидразона (КДНФГ) спонтанной ОМБ. По этим данным можно оценить степень выраженности окислительного стресса, длительность и интенсивность повреждения.

При изучении спонтанной ОМБ у пациентов с ХП/СХТБ с СА было отмечено нарастание АДНФГ, как нейтрального характера в 2 раза, так и основного характера в 2,3 раза; а также нарастание КДНФГ нейтрального характера в 1,8 раза и нарастание КДНФГ основного характера в 3,1 раза по сравнению с контрольной группой.

При изучении спонтанной ОМБ у пациентов с варикоцеле II и III степени с СА было отмечено нарастание АДНФГ, как нейтрального характера в 1,8 раза, так и основного характера в 3,2 раза; а также КДНФГ нейтрального характера в 1,4 раза и КДНФГ основного характера в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

При проведении корреляционного анализа во всех группах между подвижностью сперматозоидов и ОМБ не было выявлено статистически значимых корреляционных взаимосвязей.

Исходя из наших результатов можно предположить, что у пациентов с ХП/СХТБ с СА (группа 2) отмечается высокая доля нарастания КДНФГ, что указывает на активный переход первичных маркеров во вторичные. Снижается антиоксидантная защита организма, и он не может противостоять реакциям свободно-радикального окисления. Для пациентов с варикоцеле II и III степени с СА (группа 3) при определении индуцированного окисления также наблюдается повышение карбонильных производных в спермоплазме.

При определении доли спонтанной ОМБ в металл-катализируемой у пациентов группы 2 и группы 3 в спермоплазме наблюдалось снижение РАП. Данные результаты можно расценить как истощение резервных возможностей организма, а соответственно при этом может наблюдаться окислительный стресс (Таблица 2).

Таблица 2 – Резервно-адаптационный потенциал протеолитических систем спермоплазмы

	λ 356 АДНФГ нейтрального характера	λ 370 АДНФГ основного характера	λ 430 КДНФГ нейтрального характера	λ 530 КДНФГ основного характера
Контрольная группа	48 %	50 %	57 %	69 %
Группа 2	27 %	39 %	43 %	37 %*
Группа 3	26 %	20 %*	16 %*	14 %*

Таким образом, наблюдалось снижение РАП у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов с варикоцеле II-III степени с СА на всех длинах волн, но у пациентов с варикоцеле II-III степени с СА снижение оказалось более выражено, что может быть связано с более выраженным развитием окислительного стресса в этой группе пациентов.

При исследовании конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с СА выявлено увеличение уровня метаболитов NO в 1,4 раза, что не явилось статистически значимым по сравнению с контрольной группой. У пациентов с варикоцеле II и III степени с СА было обнаружено увеличение уровня метаболитов оксида азота в 2,5 раза, что явилось статистически значимым ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (Рисунок 7).

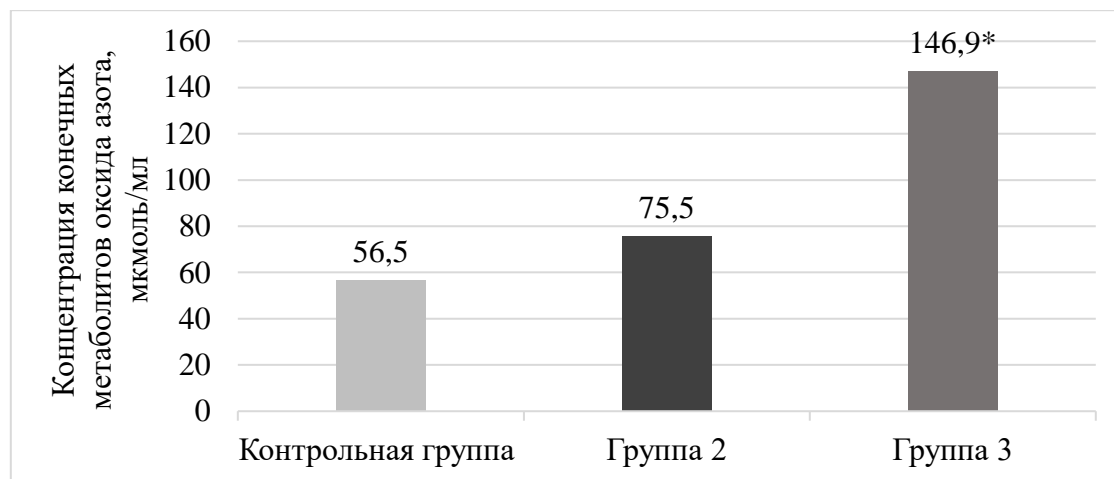


Рисунок 7 – Изменение концентрации конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов, мкмоль/мл

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

При проведении корреляционного анализа между подвижностью сперматозоидов и конечными метаболитами оксида азота в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II-III степени с СА была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней степени ($r = -0,42$, $p < 0,05$).

У обследуемых контрольной группы и у пациентов с ХП/СХТБ с СА не было выявлено достоверной корреляционной связи между указанными показателями.

При определении активности цистеиновых катепсинов В, L и Н в спермоплазме было выявлено статистически значимое снижение их активности у пациентов с ХП/СХТБ с СА и у пациентов варикоцеле II и III степени с СА по сравнению с контрольной группой (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение активности катепсинов в спермоплазме, нмоль/ч×л

	Контрольная группа Me [Q1-Q3]	Группа 2 Me [Q1-Q3]	Группа 3 Me [Q1-Q3]
Активность катепсина В (C01.060)	0,76 [0,62; 0,88]	0,18* [0,11; 0,28]	0,03* [0,02; 0,06]
Активность катепсина L (C01.032)	0,75 [0,65; 0,91]	0,18* [0,13; 0,28]	0,03 * [0,02; 0,05]
Активность катепсина Н (C01.040)	0,79 [0,65; 0,87]	0,21* [0,13; 0,30]	0,03* [0,02; 0,05]

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы (p < 0,05)

ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности биохимического статуса спермоплазмы пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, которые заключаются в снижении концентрации витамина В₁₂ и повышении уровня гомоцистеина по сравнению со здоровыми донорами.

2. Выявлены особенности окислительного и нитрозативного статуса спермоплазмы, что выражается в повышении уровня карбонилированных белков, снижении резервно-адаптационного потенциала у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией; повышении концентрации конечных метаболитов оксида азота у пациентов с варикоцеле по сравнению со здоровыми донорами.

3. Установлено снижение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ В, L, Н в спермоплазме, что может свидетельствовать об изменении параметров микроокружения сперматозоидов у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению со здоровыми донорами.

4. Уменьшение подвижности сперматозоидов ассоциируется со снижением активности катепсинов В, L, Н, снижением концентрации витамина В₁₂ и повышением гомоцистеина в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле

II и III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению со здоровыми донорами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение концентрации витамина В₁₂ в спермоплазме может использоваться для прогнозирования или оценки степени риска снижения мужской фертильности.

2. Изучение активности лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов В, L, Н) в спермоплазме может применяться для прогнозирования возможного риска снижения фертильности у мужчин.

3. Количественное определение содержания ОМБ и гомоцистеина в спермоплазме может применяться для дополнительной оценки степени выраженности окислительного стресса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Взаимосвязь активности катепсина L с подвижностью сперматозоидов у пациентов с хроническим простатитом / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, Е.И. Карпов [и др.]. – Текст : непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сборник докладов VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань, 2021. – С.96-97.

2. Зависимость подвижности сперматозоидов от активности катепсинов В и L у мужчин с бесплодием / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // Современные достижения в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой, И.И. Мечникова. – СПб., 2021. – С. 134-138.

3. **Иштулин, А.Ф.** Изменение активности катепсина В при хроническом простатите / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева – Текст : непосредственный // Материалы научно-практической конференции (69-й годичной) с международным участием, посвященной 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021). – Душанбе, 2021. – Т. 2. – С. 408-409.

4. Витамин В₁₂ как диагностический маркер снижения репродуктивной функции у мужчин / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // **Биомедицинская химия.** – 2022. – Т.68, № 3. – С. 228-231.
5. Гомоцистеин как предиктор снижения репродуктивной функции у мужчин / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // Технологии живых систем. – 2022. – Т. 19, № 3. – С. 55-63.
6. Зависимость подвижности сперматозоидов от активности катепсина Н у пациентов с бесплодием / И.В. Минаев, П.М. Полякова, **А.Ф. Иштулин** [и др.] – Текст : непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Рязань, 2022. – С. 143-145.
7. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеаз спермоплазмы у пациентов с нарушением репродуктивной функции / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – Т. 25, № 4. – С. 23-28.
8. Метаболиты оксида азота у пациентов с нарушением репродуктивной функции / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22 (Крым, Ялта-Гурзуф, 2022. Весенняя сессия). – Ялта; Гурзуф (Крым), 2022. – С. 321-324.
9. Содержание витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом и астенозооспермией / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, Е.Н. Федяева [и др.] – Текст : непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Рязань, 2022. – С. 116-118.
10. Изменение спонтанной окислительной модификации белков спермоплазмы у пациентов с варикоцеле и астенозооспермией / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2023. – Т. 26, № 1. – С. 18-22.
11. Карбонилирование белков спермоплазмы у пациентов со снижением фертильности / **А.Ф. Иштулин**, Н.В. Короткова, И.В. Матвеева [и др.] – Текст : непосредственный // **Молекулярная медицина.** – 2023. – Т. 21, № 2. – С. 60-64.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин

Нсу – гомоцистеин

АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразон

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНФГ – динитрофенилгидразин

ИФА – иммуноферментный анализ

КДНФГ – кетондинитрофенилгидразон

ОМБ – окислительная модификация белка

ОС – окислительный стресс

РАП – резервно-адаптационный потенциал

СА – сопутствующая астенозооспермия

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ХП/СХТБ – хронический простатит ПИВ/синдром хронической тазовой боли