

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинская биология

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е.И.Шишацкая

«13» июля 2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Особенности морфо-функциональных характеристик эякулята при  
различных видах патоспермии

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель _____	08.07.2020	доцент, к.б.н. Н.М. Титова
Выпускник _____	08.07.2020	А.Е. Курченко
Рецензент _____	10.07.2020	доцент, к.б.н. Р.Н. Белоногов

Красноярск 2020

## Реферат

Магистерская диссертация выполнена по теме «Особенности морфо-функциональных характеристик эякулята при различных видах патоспермии» содержит 68 страниц текстового документа, 2 иллюстрации, 5 таблиц и 70 источников литературы.

СПЕРМОГРАММА, МОРФОЛОГИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ, ДНК ФРАГМЕНТАЦИЯ, ПАТОСПЕРМИИ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Объект – эякулят: 55 пациентов с различными видами патоспермии.

**Цель работы** – исследовать морфо-функциональные характеристики, ДНК-фрагментацию и окислительный стресс в эякуляте при разных видах патоспермии.

### **Задачи:**

1. Исследовать морфо-функциональные характеристики эякулята при патоспермии.
2. Оценить степень фрагментации ДНК сперматозоидов при различных видах патоспермии.
3. Определить уровень окислительного стресса в эякуляте по показателям перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при различных видах патоспермии.

В сперматозоидах при олигоспермии выявлен достаточно выраженный окислительный стресс, обусловленный преимущественно угнетением активности глутатионовой системы. Это сказывается на снижении морфо-функциональных показателей спермограммы, повышении числа дефектов головки сперматозоида и уровня ДНК-фрагментации.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	5-6
1 Обзор литературы .....	7
1.1 Активные формы кислорода, источники образования, характеристика	7-10
1.2 Перекисное окисление липидов .....	10-13
1.3 Окислительная модификация нуклеиновых кислот .....	13-14
1.4 Антиоксидантная система организма .....	14-16
1.5 Яички и сперматогенез .....	16-18
1.6 Путь через эпидидимус: созревание сперматозоидов.....	18-19
1.7 Семенная плазма и эякулят.....	19-20
1.8 Патологические формы сперматозоидов .....	20-23
1.9 ДНК фрагментация.....	23-27
1.10 Влияние ДНК фрагментации на врожденные дефекты и возможные последствия для генетики.....	27-28
1.11 Анализ дисперсии хроматина спермы.....	28-29
1.12 Тест HALO, как лучшая методика проведения фрагментации.....	29-31
1.13 Варианты лечения высокого уровня ДНК фрагментации.....	31-32
2 Материалы и методы .....	33
2.1 Объект исследования.....	33
2.2 Макроскопическое исследование эякулята.....	34-35
2.3 Микроскопическое исследование эякулята.....	35-37
2.4 Оценка подвижности сперматозоидов.....	37-39
2.5 Общее количество сперматозоидов в эякуляте.....	39
2.6 Жизнеспособность.....	39-40
2.7 Морфология сперматозоидов.....	40-42
2.8 ДНК фрагментация.....	42-44
2.9 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	44-45
2.10 Определение содержания малонового диальдегида.....	45
2.11 Определение активности супероксиддисмутазы.....	46-47
2.12 Определение активности каталазы.....	47
2.13 Определение содержания, восстановленного глутатиона.....	47-48
2.14 Определение активности глутатионпероксидазы.....	48-49
2.15 Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	49-50
2.16 Статистическая обработка результатов.....	50

3 Результаты и обсуждение.....	51-59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	60
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	61-68

## **Введение**

Около 15% пар репродуктивного возраста страдают от бесплодия, причем мужские факторы способствуют до 50% снижения рождаемости [1]. Однако после появления ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) мало внимания уделялось оценке бесплодных мужчин. Традиционный анализ спермы оставался единственным рутинным диагностическим тестом на мужское бесплодие, несмотря на отсутствие способности отличать бесплодие от фертильных мужчин, и до 40% бесплодных мужчин имеют параметры спермы в пределах нормальных контрольных диапазонов [2]. Даже с быстрым развитием вспомогательных репродуктивных технологий (АРТ) в течение последних нескольких десятилетий, коэффициент рождаемости не превышает 30% [3]. Решение проблемы мужского бесплодия заключается в рациональном подходе к улучшению результатов лечения бесплодных пар, а не в обход мужских факторов с помощью АРТ.

Существует необходимость в поиске дополнительных диагностических методов для улучшения прогнозирования фертильности и непосредственного управления решениями бесплодных пар. Понимание мужского бесплодия на молекулярном уровне и признание целостности ДНК спермаиозидов возродили интерес к тестам функции спермы в последние годы. Появляющиеся данные о роли целостности ДНК сперматозоидов в репродуктивных результатах и развитии анализов фрагментации ДНК сперматозоидов открывают новые горизонты в клинической андрологии. Хотя рутинное использование теста при оценке бесплодия у мужчин, не поддерживается, но его ценность теста была признана в последних руководствах AUA и Европейской ассоциации урологов (EAU) [4,5].

Одной из возможных причин фрагментации ДНК сперматозоидов может быть окислительный стресс

**Цель работы** – исследовать морфо-функциональные характеристики, ДНК-фрагментацию и состояние окислительного стресса в эякуляте при разных видах патоспермии.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать морфо-функциональные характеристики эякулята при патоспермии.
2. Оценить степень фрагментации ДНК сперматозоидов при различных видах патоспермии.
3. Определить уровень окислительного стресса в эякуляте по показателям перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при различных видах патоспермии.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского государственного университета и лаборатории сперматогенеза на базе «ООО Андрогинекологической клинике»

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Активные формы кислорода, источники образования, характеристика

Активные формы кислорода (АФК), составляют отдельную систему в организме, участвующую как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах. Главным системообразующим фактором здесь является текущий уровень АФК в тканях. Система АФК самоорганизована за счёт положительных и отрицательных связей: имеется множество механизмов контроля – уровня генерации АФК в митохондриях и микросомах, контроля активности оксидаз и антиоксидантных ферментов тканей, суммарного уровня антиоксидантной активности крови. В ходе естественного старения организма (эволюции всего организма как более высокой надсистемы) изменяются различные элементы системы АФК; изменяется состояние системы АФК и в ходе различных патологических процессов. Знание системы самоорганизации АФК и основных закономерностей её функционирования важно, как для понимания закономерностей физиологического функционирования тканей организма в норме, так и особенностей течения многих патологических процессов и выбора способов активного влияния на них. [6]

Термин активные формы кислорода (АФК) объединяет целый ряд образующихся в организме промежуточных и побочных продуктов восстановления молекул кислорода, таких как супероксидный ( $O_2^-$ ), гидроксильный ( $HO\cdot$ ), пергидроксильный ( $HO_2\cdot$ ), пероксильный ( $RO_2\cdot$ ) и алкоксильный ( $RO\cdot$ ) радикалы, оксид азота ( $NO\cdot$ ), пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), гипохлорит ( $HOCl$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и др. Помимо продуктов восстановления  $O_2$ , к АФК относят также озон ( $O_3$ ) и синглетный кислород  $^1O_2$ , то есть кислород, находящийся в возбужденном (синглетном) состоянии. Все АФК, кроме синглетного кислорода, представляют собой разные химические соединения: молекулы ( $H_2O_2$ ), свободные радикалы ( $OH$ ,  $HO_2$ ), ион-радикалы ( $O_2^-$ ). Поэтому термин активные формы кислорода следует

считать собирательным, он подчеркивает высокую реакционную способность промежуточных продуктов восстановления молекулы кислорода, кислородных радикалов и их прекурсоров. [7,8]

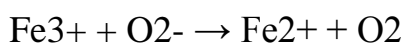
Супероксид-анион (радикал). Ключевой активной формой кислорода является супероксид анион-радикал ( $O_2^-$ ) образующейся при присоединении одного электрона к молекуле кислорода в основном состоянии. Супероксид радикал сам по себе обладает малой реакционной способностью. Он может действовать как окислитель (акцептор электрона), как восстановитель (донор электрона). В водной среде может спонтанно дисмутировать (один атом может выступать в качестве акцептора электрона, а другой в качестве донора). [9]

Время его жизни в биологических субстратах составляет около  $10^{-6}$  с. Супероксид анион-радикал представляет опасность тем, что способен повреждать белки, содержащие железо-серные кластеры, такие как аконитаза, сукцинатдегидрогеназа и NADH-убихиноноксидоредуктаза.

При кислых значениях pH супероксид анион-радикал может протонироваться с образованием более реакционноспособного пероксильного радикала ( $HO_2\cdot$ ), представляющего собой слабую кислоту. [10, 11]

$H_2O_2$  (перекись водорода). Присоединение двух электронов к молекуле кислорода или одного электрона к супероксид-аниону приводит к образованию перекиси водорода, которая является окислителем умеренной силы. Однако из перекиси водорода может образовываться гидроксид-радикал ( $OH\cdot$ ), который является весьма сильным окислителем.  $OH\cdot$  радикал может образовываться при трехэлектронном восстановлении кислорода или при взаимодействии перекиси водорода с супероксид радикал - анионом - реакция Габера-Вейса. В процессе реакции генерируется  $OH$  (гидроксил-радикал) из  $H_2O_2$  (пероксида водорода) и супероксида ( $O_2^-$ ). Реакция может возникать в клетке и вызывать окислительный стресс. Реакция проходит довольно медленно, однако катализируется ионами железа.

Первая стадия каталитического цикла включает восстановление  $Fe^{3+}$ :

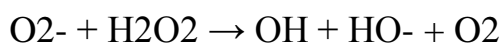




Вторая стадия:



Возникновение цепи:



В обычных условиях эта реакция протекает достаточно слабо. Токсичность перекиси водорода резко возрастает в присутствии металлов переменной валентности, что объясняется ускорением образования  $\text{OH}$  [12, 13].

$\text{OH}$  (гидроксил, гидроксид – радикал). Гидроксид-радикал практически не участвует в образовании других АФК, но является важным фактором окислительной модификации многих клеточных структур. Он может окислять молекулы белков и липидов, особенно активно атакуя мембранные липиды, которые содержат ненасыщенные двойные связи. Этот процесс приводит к образованию липидных гидроперекисей и изменению свойств клеточных мембран. Гидроксид-радикал вызывает разрыв связей в молекуле ДНК, что может вызывать глубокие повреждения генетического аппарата клеток. Константы скоростей его взаимодействия с большинством биологически важных молекул близки к диффузионным.

Вследствие высокой химической активности гидроксид-радикала, время его жизни в клетке составляет 100 нс, а расстояние, которое он может пройти от места образования до места взаимодействия с мишенью ~100 нм [14].

Гипохлорит-анион ( $\text{OCl}^-$ ). Представляет собой активную форму хлора и условно относимый к АФК, так как он обладает сходными свойствами окислителя. В ходе миелопероксидазной реакции  $\text{H}_2\text{O}_2$  ферментативно превращается в гипохлорит-анион, который является мощным окислителем. Гипохлорит - анион опасен сам по себе, а также может взаимодействовать с  $\text{O}_2$  с образованием гидроксид-радикала и с перекисью водорода с образованием синглетного кислорода.

NO-радикал. К радикальным компонентам клетки относится NO-радикал, образуемый ферментом NO-синтаза и участвующий в образовании пероксинитрита при взаимодействии с супероксидом. [7, 15]

## 1.2 Перекисное окисление липидов

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) протекает в норме с малой скоростью в мембранах митохондрий, лизосом, в мембране эритроцитов там, где имеются ненасыщенные липиды, прежде всего фосфолипиды. При ПОЛ происходит влияние на проницаемость мембран, скорость роста живого организма. Кроме этого от процесса перекисного окисления липидов зависит частота и скорость обновления клеточных мембран [16].

Все процессы ПОЛ относятся к свободно-радикальными и регулярно осуществляются в организме человека. Под действием свободных радикалов большое число молекул организма претерпевают структурные нарушения. В молекулах белков окисляются аминокислоты, в следствии чего конформация белков изменяется, образуются ковалентные "сшивки". При взаимодействии двух валентного иона железа с молекулой ДНК, образуются АФК, а именно гидроксильные радикалы. Гидроксильные радикалы – это высокореакционные соединения, которые могут разрушать структуру азотистых оснований. Отсюда следует, что гидроксильные радикалы могут повлиять на структуру ДНК. Но наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через СН<sub>2</sub>-группу. Именно от этой СН<sub>2</sub>-группы свободный радикал – инициатор окисления, легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал [17, 18].

К образованию свободных радикалов и ускорению ПОЛ приводят: • облучение ионизирующей радиацией; • металлы с переменной валентностью (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>); • некоторые диазосоединения. Степень интенсификации свободно-радикальных процессов является одним из ведущих

патогенетических факторов в развитии многих болезней. Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшенна), болезни Паркинсона, при которых ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга, при ИБС атеросклерозе, развитии опухолей. Перекисное окисление активируется также в тканях, подвергшихся сначала ишемии, а затем реоксигенации, что происходит, например, при спазме коронарных артерий и последующем их расширении [7, 19].

#### Стадии перекисного окисления липидов

Основным субстратом для свободно-радикальных реакций служат полиненасыщенные жирные кислоты в составе фосфолипидов и гликолипидов клеточных мембранах. Большое количество фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами локализуется в оболочке липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности [15]. В результате свободно-радикального окисления жирных кислот образуются гидроперексиды и диеновые конъюгаты, нестабильные молекулы, которые классифицируют как первичные продукты ПОЛ. При участии металлов переменной валентности они быстро метаболизируются, превращаясь во вторичные (альдегиды, диальдегиды) и третичные (шиффовы основания) продукты перекисного окисления липидов [15, 20]. Перекисное окисление липидов включает в себя несколько стадий: инициацию, развитие, разветвление и обрыв цепи. Во время инициации гидроксильный радикал атакует метиленовую группу, которая расположена между двойными связями, и выбивает электрон, восстанавливая  $\bullet\text{OH}$  до воды. Далее двойные связи переставляются, смещается радикальная группа и взаимодействует с кислородом. В результате образуется липопероксильный радикал.

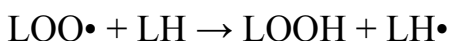
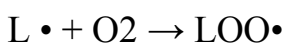
Дальнейшее взаимодействие липопероксильного радикала с соседними жирными кислотами приводит к нейтрализации и появлению новых липоперекисных радикалов, т.е. к развитию линейной цепной реакции с появлением новых окисленных жирных кислот [21].

Кроме линейного развития, может происходить разветвление реакции за счет получения гидроперекисью электронов от каких-либо металлов или при воздействии излучения. Обрыв цепной реакции происходит при взаимодействии радикалов друг с другом, либо в реакции с различными антиоксидантами.

### 1. Инициация: образование свободного радикала (L• )

Иницирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от CH<sub>2</sub>-групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала [22].

### 2. Развитие цепи

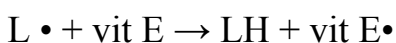
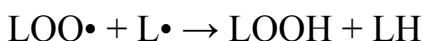


Развитие цепи происходит при присоединении O<sub>2</sub>, в результате чего образуется липопероксирадикал LOO• или пероксид липида LOOH. ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, каждый образовавшийся радикал иницирует образование нескольких других.

### 3. Разрушение структуры липидов

Продуктами перекисного окисления полиеновых кислот служат малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты [6].

### 4. Обрыв цепи – взаимодействие радикалов между собой:



Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму [6].

Продуктами перекисного окисления ненасыщенных липидов являются:

- свободные радикалы – R;
- перекисные радикалы – ROO;
- гидроперекиси – ROOH;
- альдегиды (малоновый диальдегид);
- кетоны;
- эпоксиды. [23]

### **1.3 Окислительная модификация нуклеиновых кислот**

Окислительное повреждение ДНК является одним из самых критических последствий окислительного стресса. Показано, что окислительные повреждения ДНК непосредственно связаны с повышенным риском мутагенеза, канцерогенеза, старения и патогенезом болезней пожилого возраста. Именно нарушения в хранении и реализации генетического материала связывают с развитием ряда заболеваний, таких как нейродегенеративные и ряд онкологических заболеваний. [21]

Основными продуктами окислительного повреждения ДНК являются пиримидиновые димеры, ДНК-белковые сшивки, односторонние разрывы ДНК, формамидопиримидиновые производные пуринов. Наиболее чувствительными к воздействию АФК в составе ДНК являются основания – гуанин, тимин, цитозин, аденин и дезоксирибозный остаток. Известно более 200 типов окисленных оснований ДНК. ДНК в структуре хроматина защищена гистонами от воздействия свободных радикалов. Поэтому нуклеотиды в нуклеотидном пуле, в большей степени подвержены эндогенному повреждению и образованию АФК, чем ДНК. Затем поврежденный нуклеотид

может быть встроен при репликации и системами репарации в ДНК, что приведет к трансверсии оснований в ДНК и появлению в ее составе 8-оксогуанина.[22]

8-оксогуанин (8-оксо-7,8-дигидро- 2'-дезоксигуанозин, 8-ОГ) - один из самых опасных мутагенов, является одним из основных окислительных биомаркеров повреждения ДНК и может приводить к G → T трансверсии эукариотический и прокариотических клетках, что может привести к точечному мутагенезу, нарушениям репликации и транскрипции и генетическим изменениям в организме. Известно, что 8-ОГ приводит к мутагенезу, канцерогенезу, и старению. В настоящее время показаны следующие свойства этого окисленного основания:

- 1) при включении в ДНК обладает неоднозначными кодирующими свойствами;
- 2) способен включаться в РНК;
- 3) оказывает влияние на клетки за счет связывания с ГТФ-зависимыми регуляторными белками.

Таким образом, окислительный стресс возникает, когда клетки не способны в достаточной степени регулировать уровень АФК и не в состоянии адекватно удалить или заменить окисленные макромолекулы.[17]

#### **1.4 Антиоксидантная система организма**

Образование АФК наблюдается во многих метаболических процессах и является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни. Функционирование и развитие клеток, а также организма в целом, в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, основу которых составляют ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности.

Отсутствие или сбой этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса. [24]

Основными функциями антиоксидантной системы являются: ограничение интенсивности реакции свободнорадикального и перекисного окисления; защита чувствительных к окислительным повреждениям биомолекул мембран, внутри - и внеклеточных структур от действия свободных радикалов, и перекисных соединений; восстановление окислительных молекулярных повреждений. В целом основная задача системы антиоксидантной защиты состоит в предотвращении и ограничении развития патологических состояний, вызываемых окислительными повреждениями структур организма.

Эффекторные компоненты антиоксидантной системы называются антиоксидантами. Число эндогенных соединений, относимых к антиоксидантам, постоянно возрастает. Нет единой универсальной классификации антиоксидантов. [25]

Некоторыми авторами предпринята попытка классификации антиоксидантов с точки зрения на 2 группы:

1 группа. Высокомолекулярные соединения - ферменты антиоксидантной защиты, а также белки, способные связывать ионы Fe и Cu, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов. Антиоксидантные ферменты (СОД, церулоплазмин, каталаза, глутатионзависимые ферменты) обеспечивают комплексную антирадикальную защиту биополимеров. Для ферментативных антиоксидантов характерны высокая специфичность, строго определенная органная и клеточная локализация, а также использование в качестве катализаторов металлов Cu, Fe, Mn, Zn, Se. [24,26]

К числу белков, обладающих способностью связывать металлы с переменной валентностью и соответственно обладающих антиоксидантными свойствами, относят альбумины крови, трансферрин, ферритин, лактоферрин.

Многие из них весьма эффективны в ингибировании свободнорадикальных процессов, но слабо проникают через мембраны и тканевые барьеры.

2 группа. Низкомолекулярные антиоксиданты: некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевиная кислота, глутатион, аскорбиновая кислота, билирубин, токоферол, витамины группы А, К, Р.

При этом можно говорить о своеобразных антиоксидантных цепях переноса электронов, эффективность функционирования которых определяется работой всех компонентов. [27]

Эффекты антагонизма установлены в действии смеси токоферола с природными хинонами (убихиноном, филлохиноном). Напротив, фосфолипиды усиливают активность всех антиоксидантов, независимо от их природы.

Таким образом, рассматривая в общем виде антиоксидантные системы, следует иметь в виду, что организм располагает ферментативными системами, ингибирующими ПОЛ на этапе инициации. Так, СОД инактивирует супероксид анион-радикал, субстратами действия глутатионпероксидазы и каталазы являются перекись водорода и гидроперекиси липидов.

Действие ферментных антиоксидантов дополняется в целостном организме естественными антиоксидантами, в частности, витаминами группы Е, стероидными гормонами, серусодержащими аминокислотами, аскорбиновой кислотой, витаминами группы А, К и Р, убихиноном, пептидами, производными гаммааминомасляной кислоты, фосфолипидами, продуктами метаболизма эйкозаноидов, а также тиолами, в частности, эрготионеином, содержащимся в эритроцитах печени, мозге. [25,28]

## **1.5 Яички и сперматогенез**

Сперматогенез - процесс пролиферации и дифференциации зачаточных клеток внутри тестикулярных семиниферных (извитых) канальцев, где формируются гаплоидные сперматозоиды. Сперматогенез может быть разделен на 3 стадии: (i) митотическое деление, где мужские сперматогонии



пролиферируют, (ii) мейотическое деление, где сперматоциты становятся гаплоидными клетками и (iii) стадия, когда формируются сперматиды, эта фаза характеризуется цито-дифференциацией и конденсацией хроматина и заканчивается выходом сперматозоидов в просвет извитых канальцев.[29]

Во время эмбрионального развития митоз сперматогониев останавливается и возобновляется только через несколько дней после рождения, в результате происходит дифференциация сперматогония типа А. Поскольку во время митотической фазы ядерное деление (кариокинез) завершено, а цитоплазматическое деление (цитокинез) еще нет, то первичные сперматоциты, происходящие от одного типа сперматогоний, соединены вместе тонкими цитоплазматическими мостиками, составляя огромный синцитиум. Эти цитоплазматические мостики существуют до финальной спермиации и служат для синхронизации сперматогенеза в окружающих клетках Сертоли. Во время мейоза количество хромосом уменьшается на половину и вторичные сперматоциты дифференцируются в круглые сперматиды.

Наконец, во время цито-дифференциальной фазы, названной сперматогенезом, круглая форма сперматид изменяется на более удлиненную. В конце сперматогенеза спермии выходят из клеток Сертоли в просвет извитых канальцев яичка. Это достигается благодаря разъединению цитоплазматических мостиков между созревшими сперматозоидами. Освобожденные сперматозоиды содержат цитоплазматическую каплю, которая является остатком этих мостиков. Эта цитоплазма удаляется из созревшего сперматозоида после того, как он входит в эпидидимус. [30]

Во время этих стадий существуют много точек, где могут быть репарированы возможные абберрации и где непригодные по развитию зачаточные клетки могут стать объектами для апоптоза (последнее с сопутствующим взрывом в формировании свободных радикалов). Хотя апоптоз наиболее часто протекает во время митотических стадий сперматогенеза, было продемонстрировано, что сперматоциты и сперматиды

(пахитеновые сперматоциты, круглые и удлиненные сперматиды) способны генерировать низкие уровни АФК (в основном, супероксид-анион радикал). Образование АФК стимулируется НАДФН, образующимся в метаболических путях, во время цито-дифференциальной фазы, и наибольшая продукция АФК была зафиксирована в пахитеновых сперматоцитах. [31] Неадекватный окислительно-восстановительный контроль функции гонад может стать пусковым механизмом развития репродуктивных патологий, которые часто включают окислительный стресс. [32]

### **1.6 Путь через эпидидимус: созревание сперматозоидов**

Незрелые сперматозоиды, вышедшие из яичка, претерпевают новые изменения во время прохождения эпидидимуса. Клетка сперматозоида с сильно уменьшенной и специализированной цитоплазмой сталкивается с новыми испытаниями во время транзита через придаток яичка (эпидидимус): модификациями на молекулярном уровне с существенной последующей конденсацией ДНК при входе в головку эпидидимуса. Последующая дегидратация, изменения в дезоксирибонуклеопroteинах и липидах, и изменения хода метаболического пути – явления, случающиеся во время транзита в придатке яичка. Кроме того, в процессе этих изменений при созревании спермий приобретает подвижность. В целом, при созревании сперматозоида спонтанно генерируется перексид водорода в процессе прохождения через эпидидимус и максимальный уровень продукции отмечен для хвостовой части придатка яичка. Генерация O<sub>2</sub>- обнаружена в суспензии эпидидимальных сперматозоидов, но его концентрация не коррелирует со статусом созревания сперматозоида и резко увеличивается после добавления экзогенного НАДФН.[28]

Умеренная продукция АФК самим сперматозоидом положительно коррелирует с необходимой подвижностью сперматозоида и с увеличением фосфорилирования тирозина. Низкие уровни прооксидантов способствуют

фосфорилированию тирозина, капацитации сперматозоида и пенетрации яйца, тогда как высокие уровни ингибируют или блокируют эти процессы. [32]

### **1.7 Семенная плазма и эякулят**

После завершения транзита спермиев через эпидидимус зрелые сперматозоиды продолжают путь через de vas deferens, где они будут смешаны с секретами из половых желез мужского полового тракта.

Семенная плазма содержит высокие уровни нуклеаз, нуклеотидаз и лизосомальных ферментов, таких как протеиназы, фосфатазы, гликозидазы, муколитические ферменты, особенно гиалуронидазу. [33]

Кроме того, семенная плазма играет важную антиоксидантную роль, защищая спермии от АФК, продуцируемые сперматозоидами и лейкоцитами посредством неферментативных антиоксидантов, присутствующих в семени. Примерами являются таурин и гипотаурин, токоферол (витамин E), аскорбиновая кислота (витамин C), глутатион, мочевая кислота и пируват. Также в семенной плазме функционируют ферментативные антиоксиданты, например, СОД, каталаза и ГПО. В сперме человека и кролика антиоксиданты в семенной плазме значительно снижают активность процессов ПОЛ.

Существует мнение, что повреждения ДНК при окислительном стрессе могут быть ингибированы семенной плазмой или отдельными жидкостями из половых желез, которые представлены в составе семенной плазмы. [31,34]

Подпопуляции сперматозоидов при различных стадиях созревания характеризуются различной продукцией АФК. Окислительный стресс в эякулированных спермиях может быть вызван продукцией АФК клетками (лейкоцитами) в комбинации с бедностью антиоксидантных компонентов в семенной плазме. Таким образом, ОС может являться важной причиной мужского бесплодия.

Джонс с соавторами провели первые исследования процессов ПОЛ в сперматозоидах человека. Регенерация плазматической мембраны не возможна в зачаточной клетке сперматозоида, поэтому любое значительное

повреждение мембраны этой клетки будет передаваться на оплодотворяющий «выступ». Зрелые сперматозоиды млекопитающих характерно содержат высокие уровни полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), связанные с фосфолипидами. Наиболее важные ацильные цепочки присоединены в положении sn-1 - пальмитиновая (16:0) и пальмитолеиновая (16:1) кислоты, тогда как в sn-2 положении - цепочки длиннее и с большим числом двойных связей: линоленовая (18:2), линолевая (18:3), докозанопентаеновая (22:5), докозаногексаеновая (22:6). Последние две являются основными, входящими в состав фосфолипидов эякулированных сперматозоидов. Фосфолипиды ассиметрично распределены по липидному бислою плазматической мембраны. Внешний слой (экзоплазматический сайт) плазматической мембраны обогащен холиновыми фосфолипидами: сфингомиелином (СМ), фосфатидилхолином (ФХ) и гликолипидами. Внутренний слой (цитоплазматический сайт) богат аминокислотными фосфолипидами, такими как фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и фосфатидилсерин (ФС). [35]

Вследствие активации процессов ПОЛ текучесть мембраны уменьшается и происходит перестройка фосфолипидов мембраны, что может индуцировать снижение мембранной проницаемости, являющейся прелюдией утечки и потери компартментов клетки. Ключевые мембранные ферменты (например,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  АТФазы) могут потерять как свои функции и активность, так и способность регулировать ионные потоки, имеющие отношение к подвижности спермиев. Также целостность акросомы и аксонемы может быть сильно изменена благодаря протеканию ПОЛ, что может приводить к потере, оплодотворяющей способности сперматозоидов человека и негативно коррелировать с уровнем оплодотворения *in vitro*. Однако клетка имеет такие защитные механизмы против АФК как СОД и ГПО, а также протеолитические ферменты, которые могут удалять и разрушать окисленные белки.[30,36]

## 1.8 Патологические формы сперматозоидов

Дефекты головки: головки большие, маленькие, конические, грушевидные, круглые, аморфные, с вакуолями в области хроматина, с маленькой акросомальной областью (меньше 40% площади головки), вакуолизированной акросомой, несимметрично расположенной акросомой, двойные и множественные. [31]

Дефекты шейки и средней части: «склонённая» шейка (шейка и хвост образуют угол  $90^\circ$  к длинной оси головки), асимметричное прикрепление средней части к головке, утолщённая или неравномерная средняя часть, патологически тонкая средняя часть, а также любая комбинация данных признаков.

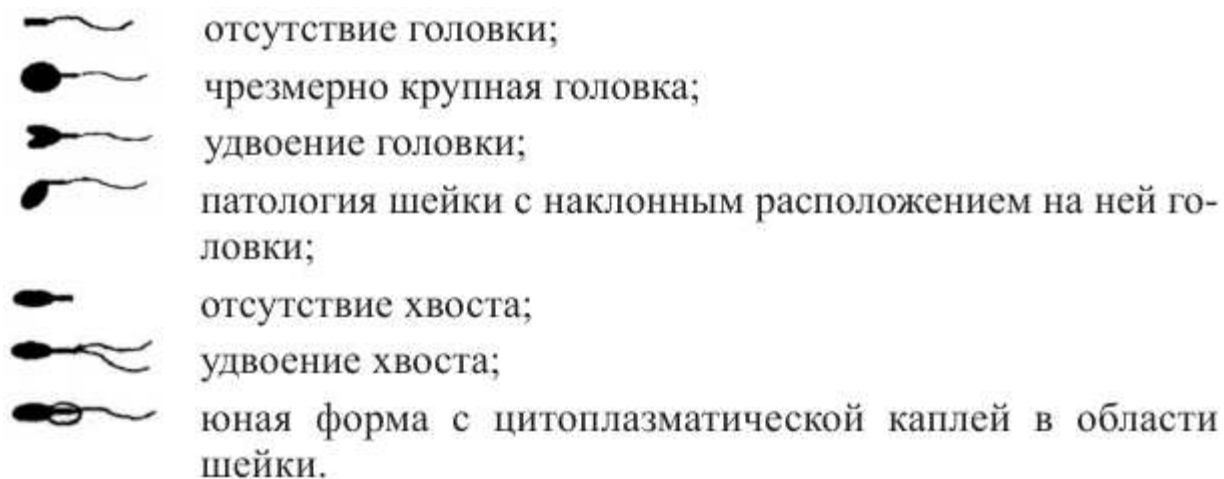
Дефекты хвоста: хвосты короткие, множественные, в виде шпильки, сломанные, наклонные (угол больше  $90^\circ$ ), неравномерная толщина хвоста, тонкая средняя часть, закрученный конец, а также любая комбинация данных признаков. [29, 31]

Цитоплазматическая капля, если она есть, в норме не должна быть более  $1/3$  головки сперматозоида. В последние годы было доказано, что наличие цитоплазматических остатков на сперматозоиде затрудняет фертилизацию. Остатки цитоплазмы, хорошо различимые при окрашивании, являются хорошим маркёром в патологиях, связанных с оксидативным стрессом. По-видимому, нарушение сперматогенеза приводит к удержанию цитоплазмы дифференцирующегося сперматозоида, в связи с чем возрастают перекисные повреждения плазматических мембран и как результат – неспособность сперматозоида проникать через блестящую оболочку и осуществлять оплодотворение.

При морфологическом анализе считаются только полностью сформированные сперматозоиды (с хвостом), изменённые (с иглоподобной, точечной головкой и головками без хвоста, если их много) анализируются и считаются отдельно. Если в препарате видно большое количество (более 20%) сперматозоидов с иглоподобной головкой, это в спермограмме следует

отметить особо. В нормальном эякуляте нормальные морфологически неизменённые сперматозоиды составляют 80-85%. Увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше референтных значений называется тератозооспермией. [33]

Наиболее частые морфологические изменения сперматозоидов:



«Круглые клетки» в препаратах спермы. Клетки сперматогенеза. В препаратах спермы встречаются клетки сперматогенеза (2-4%) на разных стадиях созревания – это сперматогонии, сперматоциты I и II порядка и сперматиды. Они хорошо различимы в нативном препарате. Это клетки правильной круглой формы, разных размеров, с плотной гомогенной цитоплазмой, с одним или несколькими ядрами также плотной структуры и круглой формы. В спермограмме считаются отдельно.

*Остаточные тельца* (свободные цитоплазматические капли) образуются в процессе формирования сперматозоида или разрушения сперматид. Остаточных телец в нормальном эякуляте практически нет, их появление обычно сочетается с образованием клеток сперматогенеза.

*Макрофаги* – это большие клетки круглой формы с эксцентрично расположенным ядром. Цитоплазма вакуолизирована и может содержать лейкоциты, фрагменты ядер разрушенных клеток, бактерии. В сперме здорового мужчины макрофагов нет. Макрофаги, фагоцитирующие

сперматозоиды, называются спермиофагами. Появление спермиофагов обусловлено длительным застоем спермы в эпидидимисе и выходом из него неполноценных или старых сперматозоидов.

*Эритроциты* в сперме здоровых мужчин не встречаются. Появление данных клеток в эякуляте носит название гемоспермии.

*Эпителиальные клетки.* В семенной жидкости можно обнаружить единичные клетки многослойного плоского ороговевающего эпителия, которые при эякуляции смываются с головки полового члена и крайней плоти. Поверхностные клетки неороговевающего многослойного плоского эпителия, выстилающие дистальный отдел ладьевидной ямки, также могут присоединиться к эякуляту. Клетки цилиндрического и переходного эпителия выстилают различные участки уретры и также могут отторгаться во время семяизвержения и выявляться в сперме. [36]

### **1.9 ДНК фрагментация**

Сперматозоид специально разработан для передачи полного гаплоидного генома в яйцеклетку, которая в конечном итоге станет новым человеком.

И успех процесса частично зависит от уплотнения генетического материала, приспособляющегося к чрезвычайно ограниченному объему ядра спермы. Протаминирование представляет собой уникальный процесс, при котором гистоны удаляются и заменяются положительно заряженными протаминами, образующими плотные тороидальные комплексы в процессе конденсации. Новые данные подтверждают важность организации хроматина во время оплодотворения и раннего развития эмбрионов. [37] На самом деле, определенная степень разрывов ДНК присутствует в сперме у фертильных мужчин, и уровень варьируется от одной спермы к другой. [38] Считается, что контролируемое высечение ДНК во время уплотнения ДНК имеет важное значение для снятия стресса в молекуле. Однако бесплодные мужчины обычно

имеют большую долю сперматозоидов с более высоким уровнем фрагментированной ДНК, чем фертильные мужчины.

Как внутренние, так и внешние факторы участвуют в патогенезе фрагментированной ДНК. Плохая структура хроматина делает сперму уязвимой для повреждения ДНК перед лицом внешних факторов. Отсутствие механизма репарации ДНК в сперме также объясняет ее восприимчивость к фрагментации ДНК. Теории abortивного апоптоза [39] и дефектного созревания [40] были предложены для объяснения внутренних факторов генерации SDF в сперматозоиде яичка. Тем не менее, имеются данные, свидетельствующие о том, что в эпидидимальной и эякулированной сперматозоидах наблюдается больше фрагментации ДНК, чем в сперматозоиде яичка, что свидетельствует о большей значимости внешних факторов у большинства пациентов.[41] Недавно окислительный стресс был идентифицирован как важная внешняя причина SDF. Присутствие большого количества полиненасыщенных жирных кислот в плазматической мембране делает сперму особенно чувствительной к повреждениям, вызванным окислительным стрессом. [42] Надфизиологический уровень активных форм кислорода (АФК) подавляет защитную антиоксидантную систему и приводит к разрывам цепей ДНК сперматозоидов. Тесная взаимосвязь между эффективностью протаминирования хроматина сперматозоидов и степенью окислительного повреждения ДНК как причины SDF суммирована на рис.1.



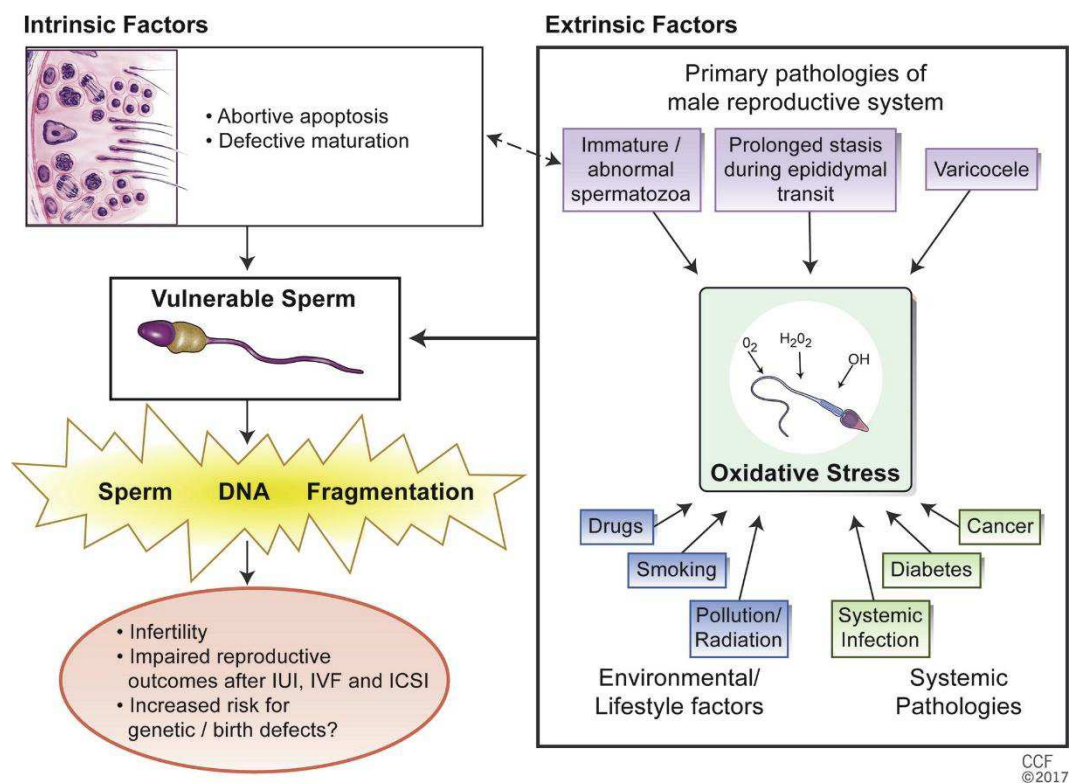


Рис. 1 Причины возникновения ДНК фрагментации сперматозоидов.

После растущего интереса к связи между SDF и снижением фертильности, прогресс в молекулярной биологии и анализах SDF в 1980-х и 1990-х годах ускорил исследования в этой области. В настоящее время клинически доступны восемь методов оценки SDF, которые обычно подразделяются на два типа: прямой и косвенный. В то время как прямые тесты измеряют степень повреждения ДНК спермы с помощью зондов и красителей, косвенные тесты оценивают восприимчивость ДНК к денатурации, которая чаще встречается в фрагментированной ДНК.[43] Среди анализов SDF анализ структуры хроматина сперматозоидов (SCSA), маркировка концевых дезоксирибонуклеотидилтрансфераз dUTP (TUNEL), дисперсия хроматина сперматозоидов (SCD) и анализ электрофореза в однослойных гелях (Comet) имеют стандартизированные протоколы и представляют собой наиболее широко используемые тесты.[44]

Хотя результаты различных анализов SDF обычно несопоставимы из-за различных аспектов измерения SDF, [45] тесты взаимосвязаны, обычно отражая свойства ДНК сперматозоидов и могут указывать на общее

происхождение повреждения. Действительно, умеренные корреляции с коэффициентами в диапазоне от 0,3 до 0,7 были зарегистрированы среди различных тестов SDF, включая анализы SCSA, SCD и TUNEL. [46] Более того, прогностическая ценность SDF как при естественной беременности, так и при АРТ постоянно сообщается в различных центрах с использованием различных методов тестирования у широкого круга пациентов. Похоже, что стандартизированный протокол и сбор образцов для анализов SDF в специализированной андрологической лаборатории с хорошим контролем качества имеют решающее значение для получения клинически полезного результата, независимо от различных используемых методов тестирования. Отсутствие четкого порогового значения для анализов SDF [41] часто рассматривается как еще одна ловушка, сдерживающая более широкое применение теста. Однако потенциал фертильности следует рассматривать с точки зрения вероятности, а не бимодального параметра. Стремление к четкому порогу диагностического теста в контексте сложной репродуктивной системы человека, вероятно, является чрезмерным упрощением. Сосуществование факторов от обоих партнеров в бесплодной паре не может быть точно оценено с помощью одного лабораторного теста на обоих партнерах. Хотя четкое пороговое значение является предпочтительным для научного исследования, разумно отрегулировать приемлемый уровень SDF в соответствии с конкретным клиническим сценарием в соответствии с другими факторами. [47]

Исследования возможной корреляции между SDF и параметрами обычной спермы привели к неоднозначным выводам. С одной стороны, сообщалось об отрицательной связи между SDF и морфологически нормальными сперматозоидами. С другой стороны, тот факт, что сперма с высоким SDF может иметь нормальную моторику и морфологию, указывает на дополнительную прогностическую ценность оценки. Фактически, недавно была подтверждена ценность SDF как независимого атрибута качества спермы в дополнение к обычному анализу спермы. Более высокий уровень SDF также

обнаружен у мужчин с аномальными параметрами спермы и нормозооспермными партнерами бесплодных пар. [48] Результаты теста SDF в определенной степени отражают общее качество спермы и дополняют анализ спермы, но более значимы и различны, чем обычные параметры спермы. [49]

### **1.10 Влияние ДНК фрагментации на врожденные дефекты и возможные последствия для генетики**

Развитие ИКСИ произвело революцию в лечении бесплодия. Техника потенциально может обойти даже самую серьезную форму мужского бесплодия и дать ребенку бесплодную пару. [50] Тем не менее, безопасность АРТ по-прежнему вызывает озабоченность, особенно в связи со знаниями SDF за последние несколько десятилетий. Более высокая частота хромосомных аномалий у кандидатов в ИКСИ и повышенная частота анеуплоидии, связанная с повышенным SDF, подтверждают опасения по поводу возможных генетических дефектов у потомства. [51] Исследования на животных на моделях мышей показали отрицательное влияние высокого SDF на потомство, включая преждевременное старение, аберрантный рост и поведение, а также увеличение частоты опухолей.

Влияние курения и отцовского возраста на SDF является косвенным доказательством влияния SDF на здоровье детей. У заядлых курильщиков наблюдается более высокий уровень образования SDF и окислительных аддуктов в сперме, и это может объяснить предполагаемое увеличение заболеваемости раком у детей у заядлых курильщиков. Нарушение целостности ДНК спермы у стареющих мужчин было связано с доминантными генетическими заболеваниями, полигенными неврологическими расстройствами и врожденными дефектами. [52]

Утверждается, что отсутствуют прямые доказательства, демонстрирующие вредное влияние высокого SDF на потомство человека. Тем не менее, косвенные данные исследований на животных вызывают тревогу. Не

следует упускать из виду неясные долгосрочные последствия передачи дефектных генов, особенно в случаях чрезвычайно высокого SDF, обработанного ИКСИ. Качественное изучение человека невозможно из-за этических вопросов. Также может потребоваться миллионы детей ИКСИ и несколько поколений, прежде чем можно будет прийти к какому-либо твердому заключению. Скептицизм будет сохраняться до тех пор, пока на вопрос о взаимосвязи между SDF и генетическими дефектами не будут даны результаты продольных исследований с достаточным количеством выборок и продолжительностью. [53, 54]

### **1.11 Анализ дисперсии хроматина спермы**

Анализ дисперсии хроматина спермы был описан как простой и недорогой метод анализа фрагментации ДНК сперматозоидов. Он основан на том принципе, что сперматозоиды с фрагментированной ДНК не дают характерного ореола, который наблюдается, когда сперма смешивается с агарозой после денатурации кислоты и удаления ядерных белков. [55]

Методология теста включает в себя следующие этапы. Сперму погружают в агарозную матрицу на предметном стекле, обрабатывают кислотным раствором для денатурирования ДНК, содержащей разрывы, и затем обрабатывают лизирующим буфером для удаления мембран и белков. Агарозная матрица позволяет работать с нефиксированной спермой на предметном стекле в суспензионной среде. Удаление ядерных белков приводит к появлению нуклеоидов с центральным ядром и периферическим ореолом диспергированных петель ДНК. После флуоресцентного окрашивания ядра сперматозоидов с повышенной фрагментацией ДНК образуют очень маленькие гало дисперсии ДНК или вообще не образуют их, тогда как сперматозоиды с низким уровнем фрагментации ДНК высвобождают свои петли ДНК, образуя большие гало. Эти результаты были подтверждены флуоресцентной гибридизацией *in situ* с обнаружением разрыва ДНК, процедура, в которой ограниченные одноцепочечные мотивы ДНК,

генерируемые из разрывов ДНК, могут быть обнаружены и определены количественно.[53,55]

Тест не основан на интенсивности флуоресценции, поэтому его легко анализировать с помощью световой микроскопии. Тест не требует использования сложных контрольно-измерительных приборов; это может быть выполнено с оборудованием, обычно доступным в андрологических лабораториях (микроскоп). Конечные точки испытаний (недисперсные и дисперсные ядра) могут быть легко получены без тщательной подготовки лаборантов. [56]

Несмотря на простоту использования, некоторые ограничения анализа хорошо известны. Сообщалось, что анализ содержит нуклеоиды низкой плотности, которые слабее с менее контрастными изображениями. Таким образом, периферический предел гало, где хроматин является еще менее плотным, может не точно отличаться от фона. Кроме того, все гало не обязательно находятся в одной визуальной плоскости агарозы; следовательно, использование программного обеспечения для анализа может привести к неправильному чтению из-за нефокусированных ореолов. [57] Наконец, сперматозоиды не сохраняются; поэтому отличить сперму от других загрязняющих клеток проблематично.

### **1.12 Тест HALO, как лучшая методика проведения фрагментации**

Сущность данного теста заключается в исследовании хроматина сперматозоидов. Благодаря ему можно достаточно точно определить индекс фрагментации. Фрагментация ДНК может встречаться у 25% мужчин. Они годами могут лечиться от бесплодия и не подозревать при этом, что является настоящей причиной такого состояния. Фрагментация ДНК, определяемая тестом HALO, дает полное понимание сущности проблемы бесплодия мужчины. В тесте учитываются и изучаются исключительно сперматозоиды. [58]

Для проведения анализа необходимо сдать сперму. Расшифровка результатов исследования может выглядеть следующим образом:

1. Фрагментация до 15% — беременность возможна. Лучшее процентное содержание сперматозоидов.
2. Фрагментация 15-25% — беременность возможна, но потребуется время или ЭКО.
3. Фрагментация более 30% — рекомендовано ЭКО.
4. Фрагментация более 50% — рекомендовано ИКСИ;
5. Фрагментация более 60% — рекомендовано ИКСИ или семенная жидкость донора.

#### *Опасности для ДНК сперматозоидов*

Существует определенное количество неблагоприятных факторов, воздействующих на структуру цепочек ДНК у сперматозоидов. Различают внешние и внутренние факторы. [59, 60]

Внутренними факторами негативного влияния на ДНК являются:

1. Неверный отбор сперматозоидов. Сами они образуются непосредственно в семенниках. С самого начала своего развития они могут нести отклонения в строении и в генетике. В организме мужчины существует специальная система отбраковки. Именно она отбраковывает патологические сперматозоиды. Однако в некоторых ситуациях такая система может и не сработать. Результатом является проникновение в эякулят сперматозоидов с различными повреждениями в генетической структуре.

2. Неполное дозревание. Дозревание сперматозоидов постепенно происходит в придатках яичек. С течением времени в ядрах сперматозоидов начинает активироваться хроматин. Если дозревание по каким-то причинам не произошло, то ДНК мужских половых клеток серьезно повреждается.

Внешними причинами патогенного воздействия на структуру ДНК являются:

1. Рентгеновское облучение или химиотерапия больного.
2. Варикоз больного, развившийся в семенных канатиках.

3. Повышение температуры тела у больного.
4. Наличие воспалительных процессов, носящих острый характер течения.
5. Влияние токсичных веществ.
6. Посттестиккулярный стресс у больного.

Нужно понимать, что прохождение мужских половых клеток через эпидидимий может также привести к явлению дефрагментации ДНК. [61]

### **1.13 Варианты лечения высокого уровня ДНК фрагментации**

Отсутствие эффективного лечения для высокого уровня ДНК фрагментации было основным препятствием в клиническом применении. Ситуация в последнее время меняется в связи с появлением новых данных, подтверждающих различные стратегии лечения для уменьшения ДНК фрагментации или выбора сперматозоидов с более высоким содержанием хроматина для АРТ. Попытки приема пероральных антиоксидантов, репарации варикоцеле, периодических эякуляций отдельно или в сочетании с методами отбора сперматозоидов и использования сперматозоидов яичка для ИКСИ предпринимались с различной частотой успеха. [62]

#### *Короткое воздержание*

Был изучен эффект сокращения эякуляторного воздержания и повторной эякуляции как потенциального средства снижения ДНК фрагментации в чистой сперме. Снижение доли сперматозоидов с поврежденной ДНК на 22–25% было достигнуто при эякуляторном воздержании в течение 1-2 дней без ущерба для обычных параметров спермы. Было показано, что вызванный окислительным стрессом ДНК фрагментации вовремя эпидидимального транзита способствует фрагментации у большинства пациентов. Это дает возможное объяснение влияния повторяющейся эякуляции на уменьшение ДНК фрагментации за счет

сокращения продолжительности эпидидимального транзита и возможного воздействия ROS. [63,64]

#### *Пероральная антиоксидантная терапия*

Поскольку окислительный стресс был исследован и, как было установлено, играет пагубную роль в целостности ДНК сперматозоидов, использование перорального антиоксиданта было изучено в попытке уменьшить окислительный стресс и, следовательно, ДНК фрагментацию. Возможный положительный эффект был предложен в исследованиях, сообщавших о различной степени снижения ДНК фрагментации после антиоксидантной терапии различными комбинациями пероральных антиоксидантов. Применение пероральных антиоксидантов для лечения повышенного уровня ДНК фрагментации было изучено в парах с неудачной попыткой ИКСИ. Увеличение частоты клинической беременности было отмечено после 2-месячного лечения ежедневным приемом витамина С и Е, а снижение ДНК фрагментации наблюдалось у 76 % мужчин. Недавний Кокрановский обзор предположил положительное влияние пероральных антиоксидантов на показатели рождаемости в парах, посещающих клинику репродуктивной функции, на основании небольшого числа исследований. Требуются дополнительные исследования, включающие тщательный отбор пациентов с высоким уровнем ДНК фрагментации, вызванным окислением, и стандартизированной схемой лечения. [65,66]



## **2. Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Объектом исследования служил эякулят, который обрабатывался по норме ВОЗ (Макро- и микроскопическое исследование эякулята, концентрация, активность, подвижность, морфология и ДНК-фрагментация).

Обследована группа мужчин – 55 человек. Средний возраст 35 +/- 5 лет.

В контрольную группу вошли 35 мужчин на фоне полного здоровья, 10 мужчин вошли в группу нормозооспермии, но с нарушением ДНК фрагментации, третья группа – 10 мужчин с астенозооспермия. От каждого пациента было получено подписанное информативное согласие на участие в исследовании.

Обработка эякулята и все манипуляции проводятся, при помощи современного светового микроскопа - *NikoneclipseE200*, оборудованного специализированной высокочувствительной камерой и программного обеспечения – *SCAevolution*. Именно благодаря программному обеспечению мы проводим интересующий для нас вид анализа. Модуль, *SCA подвижность*, предназначен для изучения концентрации, активности и подвижности сперматозоидов, модуль *SCA морфология* – морфологии сперматозоидов, и модуль *SCA ДНК* – ДНК-фрагментации.

Для биохимических исследований спермии отделяли от семенной жидкости центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Полученный осадок промывали в десяти-кратном объеме 0,9 %-ного NaCl и вновь центрифугировали в течение 10 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Такую процедуру повторяли 3 раза. Полученный объект исследования использовали для измерения содержания продуктов перекисного окисления липидов и изучаемых компонентов антиоксидантной системы спектрофотометрическим методом. Количество белка для последующих расчетов определяли микробиуретовым методом.

## **2.2 Макроскопическое исследование эякулята**

Обязательным при макроскопическом исследовании является определение следующих параметров:

### *1 Консистенция.*

Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая. Под влиянием ферментов предстательной железы через 10-60 минут эякулят здорового мужчины при комнатной температуре разжижается. Если в течение 60 минут он остаётся вязким, можно думать о воспалении предстательной железы. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов. Кроме того, в сперме могут встречаться тяжи слизи, конгломераты, комочки прозрачного, белого, желтого, коричневатого, сероватого цвета, включающие в себя различные клеточные элементы.

### *2 Вязкость.*

Определяется длиной растяжения нити между стеклянной палочкой и поверхностью эякулята через 1 час после его разжижения; в норме не должна превышать 20 мм.

### *3 Объем.*

Определяется сразу же после разжижения в доставленном контейнере, если он градуирован. Если на контейнере градуировки нет, содержимое переливается в градуированную центрифужную пробирку. В норме объем эякулята составляет 2-6 мл, максимальный объем может достигать 15 мл. Объем эякулята не влияет на фертильность.

### *4 Цвет.*

Нормальная семенная жидкость серовато-белого или молочного цвета, слегка опалесцирует. Значительно повышенное количество лейкоцитов (пиоспермия) может придать ей желтоватый оттенок, наличие эритроцитов (гематоспермия) – красноватый, отсутствие сперматозоидов может повлиять на её прозрачность.

### *5 Запах.*

Запах эякулята напоминает запах каштанов, что обусловлено наличием в нем сперминов. Гнилостный запах может появиться при длительном хранении за счет размножения микрофлоры.

### *6 Реакция (рН).*

Реакция спермы в норме слабощелочная или щелочная. Резкощелочная реакция свидетельствует о патологии предстательной железы. При закупорке семявыносящих протоков обоих семенных пузырьков отмечается кислая реакция спермы. Определяют рН сразу после разжижения спермы с помощью индикаторных полосок по стандартным методикам.

## **2.3 Микроскопическое исследование эякулята**

Просмотр эякулята на стекле – это только ориентировочное исследование, требующее дальнейшего уточнения. Оно осуществляется следующим образом: на чистое, обезжиренное предметное стекло (предварительно согретое до температуры хранения эякулята) наносится капля эякулята (10 мкл), которая слегка распределяется до получения тонкого слоя (в толстой капле хуже просматривается клеточный состав). Для создания тонкого слоя необходимо покрыть каплю покровным стеклом, не прижимая. Приготовленный препарат стабилизируется 1 минуту, затем просматривается в микроскопе с окулярами \*7 или \*10 и объективами \*8, \*10 или \*20 со спущенным конденсором и открытой диафрагмой.

Оценивается клеточный состав эякулята, примерная подвижность сперматозоидов, их морфология, наличие агглютинации, агрегации, слизи, присутствие «круглых клеток» (эритроцитов, лейкоцитов, клеток сперматогенеза, эпителия), элементов сока простаты, кристаллов Беттхера.

При микроскопическом исследовании обязательной является оценка следующих параметров.

1. Агглютинация сперматозоидов. Скопление подвижных сперматозоидов без каких-либо клеток свидетельствует об агглютинации. В

норме у практически здоровых пациентов агглютинации сперматозоидов нет.

Степень данного показателя оценивается полуколичественно:

«-» – отсутствие;

«+» – слабо выраженная: в нативном препарате до 10 кучек сперматозоидов по 4-6 в каждой;

«++» – значительная: в препарате более 20 кучек сперматозоидов по 4-8 в каждой;

«+++» – резко выраженная: в препарате более 20 кучек, в каждой более 20 сперматозоидов;

«++++» – тяжёлая степень: все подвижные сперматозоиды находятся в состоянии агглютинации.

2. Агрегация сперматозоидов. Скопление неподвижных сперматозоидов свидетельствует об агрегации. Небольшие скопления неподвижных клеток часто присутствуют в семени здоровых мужчин, и это является нормальным, в то время как большие скопления, содержащие сотни сперматозоидов, – патология.

3. Слизь является содержимым предстательной железы и семенных пузырьков, в нормальном эякуляте отсутствует. В большом количестве попадает в эякулят при простатите или везикулите. Она плотно обволакивает сперматозоиды, замедляя их подвижность и скоростные параметры, искажает точное определение количества и концентрации сперматозоидов.

4. Лецитиновые зёрна (липоидные тельца) – это мелкие блестящие зёрнышки, содержащиеся в нормальной сперме в большом количестве. При воспалении их количество значительно уменьшается или они исчезают совсем.

5. Амилоидные тельца (гиалиновые шары) – крупные округлые образования с концентрическими дугами и окружностями, появляющимися при изменении глубины резкости, служат следствием застойных явлений в предстательной железе.

6. Кристаллы спермина (Беттхера) могут быть ромбовидной или друзообразной формы, различных размеров. Образуются при охлаждении спермы из спермина и фосфорнокислых солей. Встречаются через 1 час после получения эякулята крайне редко, при суточном исследовании – гораздо чаще. С количественными и качественными показателями эякулята напрямую не связаны.

Кроме того, эякулят содержит другие клетки, которые определяются как «круглые». Они включают в себя клетки сперматогенеза, лейкоциты, эритроциты, макрофаги, остатки цитоплазмы (остаточные тельца) и эпителиальные клетки, чаще из урогенитального тракта.

#### **2.4 Оценка подвижности сперматозоидов**

При проведении исследования обязательно должен соблюдаться принцип термостабильности. Оценка подвижности проводится в двух каплях семени, в каждой из которых рассматривается по 100 сперматозоидов. Если различие в количестве подвижных сперматозоидов в этих каплях составляет больше 10%, готовят третий препарат, снова оценивают подвижность, после чего среднее значение рассчитывают по трём препаратам.

Сперматозоиды традиционно оцениваются по следующим категориям:

- А – быстрое поступательное движение;
- В – медленное или вялое поступательное движение;
- С – непоступательное движение (колебательное или маятникообразное, манежное);
- D – неподвижные сперматозоиды.

Для оценки подвижности в окуляр  $\times 10$  или  $\times 15$  вкладывают окошко Фонио и с объективом  $\times 40$  подсчитывают сперматозоиды. В первую очередь оцениваются сперматозоиды А, в следующие 5 секунд – проходящие через окошко Фонио малоподвижные сперматозоиды В, затем С. В конце просмотра подсчитываются сперматозоиды. Для набора 100 сперматозоидов анализируют несколько полей. Если сперматозоидов мало, подсчёт проводят

без окошка Фолио. При наличии в препарате агглютинации или агрегации, в которые вовлечены 10-15% сперматозоидов, оценка подвижности проводится только по свободным формам.

Для оценки подвижности сперматозоидов также может применяться камера Горяева. Для этого сперму с помощью полуавтоматических дозаторов разводят в 20 раз физиологическим раствором (исследуемый эякулят в количестве 0,02 мл разводится в 0,4 мл подогретого физиологического раствора), который перед использованием согревают до температуры термостатирования эякулята. Разведение эякулята проводится многократным пипетированием, при этом необходимо кусочком бинта убирать остающуюся каплю эякулята с кончика наконечника дозатора для более точного получения нужного объёма. Камеру Горяева перед исследованием тщательно протирают кусочком чистого бинта, слегка смоченного в 96° спирте. Также необходимо обработать и покровное стекло.

Разведение эякулята в физиологическом растворе, пипетирование, заливание его в камеру Горяева являются травмирующими факторами и сами по себе приводят к снижению качественных параметров сперматозоидов.

Нельзя проводить микроскопическое исследование непосредственно после заливания в камеру разведённого эякулята, необходимо дать возможность механически «травмированным» сперматозоидам восстановить подвижность. Оптимальным является проведение исследования через 0,5-1 минуту после внесения эякулята в камеру Горяева. В камере смотрят только неподвижные и малоподвижные сперматозоиды. Расчёт ведут по формуле:

$X=A-(B+C)$ , где А – общее количество сперматозоидов;

В – количество малоподвижных сперматозоидов;

С – количество неподвижных сперматозоидов.

Отсюда количество активноподвижных сперматозоидов составляет (Y):

$$Y = \frac{X \times 100}{A} .$$

Ответ выдаётся в процентах.

Подвижность сперматозоидов в норме регистрируется при их количестве:

- с нормальной подвижностью – более 50% (группы А + В):
- с поступательным быстрым движением (группа А) – 25% и более;
- с поступательным медленным движением (группа В) – 25% и менее;
- с маятникообразным движением и неподвижных (С+D) – 50% и менее.

При комнатной температуре сперматозоиды сохраняют подвижность в течение 12-24 часов, при этом в первые 2 часа подвижность не снижается, к концу 5-го часа уменьшается примерно в 2 раза.

## **2.5 Общее количество сперматозоидов в эякуляте**

Количество сперматозоидов в эякуляте рассчитывают, умножая количество в 1 мл спермы на весь объём материала. Например, объём доставленной спермы – 5 мл, количество сперматозоидов в 1 мл эякулята – 30 000 000 : 30 000 000 × 5 = 150 000 000 в доставленной сперме.

## **2.6 Жизнеспособность**

Жизнеспособность исследуется при помощи набора - VitalScreen. Жизнеспособность спермы отражается в пропорции живых и мёртвых сперматозоидов. Сперма считается работоспособной при наличии в образце 50% или более живых сперматозоидов. VitalScreen использует метод окрашивания эозином-нигрозинном для определения процентного содержания живых сперматозоидов. Методика основана на том принципе, что мертвые клетки принимают на себя эозин и, как результат, становятся красными. Нигрозин обеспечивает темный фон, облегчающий считывание слайда. VitalScreen обеспечивает точную оценку подвижных сперматозоидов, если процент мёртвых сперматозоидов не превышает процент неподвижных, путем исключения процентного содержания неподвижных.

1. Оценить образец спермы, желательно в течение 1 часа после семяизвержения.

2. Смешать 50 мкл спермы с 2 каплями реагента 1 в стерильной пробирке. Избегать контакта между бутылкой с реагентом и пробиркой, содержащей сперму. Смешать осторожно.

3. Через 30 с добавить 3 капли реагента 2 и тщательно перемешать. Избегать контакта между бутылкой с реагентом и пробиркой, содержащей сперму.

## **2.7 Морфология сперматозоидов**

Традиционное исследование морфологии сперматозоидов проводится путём микроскопирования нативного прижизненного препарата (увеличение  $\times 400$ ). Использование такого метода не позволяет оценить многие морфологические изменения в структуре сперматозоида. В последние годы были предложены новые более детальные методы анализа, основанные на приготовлении препаратов эякулята с последующим их окрашиванием красителями, позволяющими чётко различать структуру клеток. Это дало возможность не только детально характеризовать морфологическую структуру сперматозоида, но также дифференцировать лейкоциты и клетки герминативного эпителия от других «круглых клеток». Такие методы позволяют выявить аномалии, неразличимые при стандартном анализе.

В лабораториях нашей страны для окраски препаратов, приготовленных из спермы, применяют унифицированные гематологические методы – окрашивание по Нохту, Романовскому–Гимзе или Паппенгейму–Крюкову. В большинстве андрологических лабораторий используется метод окраски по Папаниколау.

Для исследования морфологической структуры сперматозоидов из свежей спермы готовятся два препарата. При концентрации сперматозоидов около  $20 \times 10^6$  клеток/мл или выше для мазка можно взять 5 мкл спермы. Если концентрация менее  $20 \times 10^6$  клеток/мл, на предметное стекло помещается 10-



20 мкл спермы, которая равномерно распределяется по стеклу. При очень низкой концентрации (менее  $10 \times 10^6$  клеток/мл) препараты готовятся из осадка, полученного после центрифугирования спермы.

Хорошие препараты для окрашивания получить трудно, поскольку разная вязкость приводит к неравномерному распределению сперматозоидов. Поэтому при наличии большой вязкости семя может быть промыто физиологическим раствором, отцентрифугировано, супернатант отброшен. Осадок необходимо ресуспензировать до концентрации, удобной для получения препарата.

Окрашенные препараты анализируются с иммерсионным маслом под объективом  $\times 100$ . Переходя от поля к полю, анализируется каждый из 100, а лучше из 200 сперматозоидов для уменьшения их вариабельности. Оценивается процентное соотношение в эякуляте морфологически нормальных и измененных сперматозоидов (в целом и по отдельным видам изменений). У каждого сперматозоида характеризуются строение головки, состояние акросомы, наличие цитоплазматической капли, дефектов средней части и хвоста.

По критерию ВОЗ головка нормального сперматозоида должна быть овальной формы и иметь длину 4,0-5,5 мкм, ширину 2,5-3,5 мкм, отношение длины к ширине 1,5-1,75. Средняя часть должна быть тонкой, около 1 мкм шириной и в 1,5 раза длиннее головки, хвост – прямым, тоньше средней части и около 45 мкм длиной. Свёрнутый хвост может свидетельствовать о низкой подвижности сперматозоидов, а при их большом скоплении – о гипоосмотическом стрессе. Цитоплазматическая капля у нормального сперматозоида не должна превышать 0,3 длины головки.

Кроме оценки морфологии, согласно строгим критериям, необходимо обращать внимание на состояние акросомальной области. Нормальная акросома должна быть хорошо определяемой и занимать от 40 до 70% головки. Головка сперматозоида может классифицироваться как нормальная только в

том случае, если она имеет нормальную акросому. Все остальные формы сперматозоидов считаются морфологически аномальными.

## **2.8 ДНК фрагментация**

Определение ДНК фрагментации производится при помощи программного софта и набора - HT-HSG2.

### *Принцип метода*

Метод основан на принципе хроматиновой дисперсии (SCD-test). Неповреждённые сперматозоиды (свежие, замороженные, размороженные) иммерсируют в геле инертной агарозы на пред-подготовленном слайде. Кислотная обработка денатурирует ДНК и позволяет дифференцировать фрагментированные спермальные клетки. Лизирующий раствор, растворяет протеины ядра. В клетках с нормальным уровнем ДНК, петли ДНК расширяются, формируя свечение «хало» ДНК – хроматиновой дисперсии. В клетках с поврежденной ДНК, свечение «хало» отсутствует или минимально.

### *Перед началом работы*

- Поместить тубу с агарозой (ACS) в водяную баню, 95-100°C и расплавить в течение 5 мин, или в микроволновой печи – в течение 2 мин. Подготовить 10 пробирок эппендорфа (ЕРТ) для дальнейшего использования, заполнив их расплавленной агарозой по 10 мкл в каждую.

- Довести растворы 1 (DA) и 2 (LS) до комнатной температуры 22°C.

Растворение образца спермы в микрогеле агарозы.

1. Разбавить образец спермы промывочной средой или фосфатным буфером до концентрации максимум 20 млн на 1 мл.

2. Поместить пробирку Эппендорфа с агарозой в поплавок и перенести в водяную баню t 95-100 °C на 5-10 мин или до тех пор, пока не расплавится агароза. Затем перенести в водяную баню t = 37 °C для понижения температуры.

3. Перенести 50 мкл образца спермы в 100 мкл микрогеля агарозы и осторожно перемешать пипеткой. Поддерживать температуру смеси на уровне 37°C во избежание затвердения агарозы до начала шага 4.

4. Поместить каплю клеточной суспензии объёмом 8 мкл в центр лунки (S). Накрыть покровным стеклом. Осторожно прижать, избегая образования воздушных пузырьков. Слайды должны находиться в горизонтальном состоянии до окончания процесса. Использовать лунку (C) для контрольного образца. Halotech рекомендует периодически перепроверять полученные результаты на контрольных образцах.

5. Поместить слайд на холодную поверхность (металлическую или стеклянную), предварительно охлаждённую до 4°C, а затем перенести в холодильную камеру (4°C) на 5 мин для затвердевания агарозы.

#### *Обработка образца*

6. Извлечь слайд из холодильной камеры и осторожно удалить покровное стекло. Обработку слайда проводить при комнатной температуре 22°C.

7. Поместить слайд горизонтально в чашку Петри или в другую похожую ёмкость. Внести раствор 1 (DA) на лунку S, убедиться, что она полностью им покрыта. Инкубировать в течение 7 мин. Высушить в горизонтальном положении.

8. Поместить раствор 2 (LS) на лунку S, убедиться, что она полностью им покрыта. Инкубировать в течение 20 мин. Высушить в горизонтальном положении.

9. Промыть слайд в течение 5 мин с помощью пипетки дистиллированной водой. Высушить в горизонтальном положении. Дегидрировать 70%-ным этанолом, используя пипетку, и инкубировать в течение 2 мин. Высушить и обработать 100%-ным этанолом в течение 2 мин. Просушить. После высыхания слайды могут храниться в сухом тёмном месте при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

### *Восстановление и визуализация.*

10. Поместить слайд горизонтально на поплавок, в чашку Петри. Нанести в лунку раствор 3 (SSA) и убедиться, что она полностью им покрыта. Инкубировать в течение 7 мин. Высушить в горизонтальном положении. Использовать аналогично раствор 4 (SSB). Инкубировать в течение 7 мин. Высушить в горизонтальном положении при комнатной температуре.

11. Визуализация под световым микроскопом. Если восстановление слишком интенсивное, дополнительно промыть слайд в проточной воде. Если восстановление слишком слабое, то поместить слайд в 100%-ный этанол и повторите шаг №10.

### *Чтение результата*

12. Подсчитать процентное количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Результаты оценить, принимая во внимание все клинические и лабораторные результаты

## **2.9 Определение содержания диеновых конъюгатов**

Вследствие  $\pi$ - $\pi$  переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением при 232-234 нм.

Определение содержания ДК проводили в экстрактах сперматозоидов. Для этого липиды из сперматозоидов экстрагировали стократным избытком смеси растворителей (гептан-изопропанольная смесь в соотношении 1:1). В гомогенизатор вносили 0,1 мл сперматозоидов, добавляли 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирали до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносили в мерную центрифужную пробирку с помощью стеклянной палочки. Ступку, пестик гомогенизатора и палочку тщательно дважды обмывали гептаном общим объемом 5 мл. Сливы помещали в ту же пробирку с притертой пробкой, чтобы избежать испарения экстрагирующей фазы при следующих процедурах.

На следующем этапе экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 1700g. Надосадочную фракцию переносили в градуированные пробирки и добавляли 1/5 объема 0,74 %-ного водного раствора хлорида калия для отмывки липидного экстракта от пептидных примесей. После тщательного встряхивания отбирали гептановый экстракт (верхнюю фазу) исследовали содержание сопряженных диенов, которые определяли по оптической плотности пробы при 233 нм. В качестве контроля использовали гептан. Содержание ДК рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции для ДК при длине волны 233 нм, равный  $27000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  и выражали в нмолях на грамм белка.

### **2.10 Определение содержания малонового диальдегида**

В липидных системах в результате процессов ПОЛ образуется МДА, взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.

К 0,2 мл упакованных сперматозоидов добавляли 0,8 мл физиологического раствора и 0,5 мл 30% трихлоруксусной кислоты. Перемешивали, затем центрифугировали 15 мин при 1700g. 1 мл супернатанта переносили в другую пробирку, добавляли 0,075 мл 0,1 М ЭДТА и 0,25 мл 1 % ТБК, растворенной в 0,05 н растворе NaOH. Содержимое перемешивали и ставили пробирки в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали при комнатной температуре.

Поглощение опытной пробы измеряли на спектрофотометре против контрольной пробы при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1,0 см. Содержание МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равный  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  и выражали в нмолях на г белка.

## 2.11 Определение активности супероксиддисмутазы

Принцип метода основан на ингибировании реакции автоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления и, по-видимому, одновременным участником его последующих стадий.

Исходная концентрация адреналина в пробе составляла 230 мкМ. Об интенсивности его автоокисления судили по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, не описанного ранее в литературе, и опережающим по времени образованием адrenoхрома (с максимумом поглощения при 480 нм)

*Реактивы:*

1. 0,1 %-ный ( 5,46 мМ ) аптечный раствор адреналина.
2. Бикарбонатный буфер, рН=11 (2,12 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,168 г  $\text{NaHCO}_3$ , 0,074 г ЭДТА растворяли в 200 мл дистиллированной воды, рН доводили до нужного значения добавлением  $\text{NaOH}$ ).

*Ход определения:*

В качестве источника СОД использовали спермоцитарный лизат или семенную жидкость. В пробирку типа "Эппендорф" добавляли 50 мкл упакованных сперматозоидов (семенной жидкости), 450 мкл дистиллированной воды, предварительно охлажденной. Полученный лизат интенсивно перемешивался и центрифугировался при 6000g в течение 15 минут. Супернатант использовался для определения активности СОД.

Анализ проводился в кювете объемом 3 мл при комнатной температуре. Порядок внесения реагентов в пробу представлен в таблице

Реагенты	Холостая	Опытная
Реактив 2	3 мл	3 мл
Супернатант	–	0,05 мл
Реактив 1	0,15 мл	0,15 мл

После внесения адреналина в пробу, содержащую бикарбонатный буфер, содержимое кюветы тщательно и быстро перемешивалось. Изменение оптической плотности регистрировалось через каждые 30 секунд в течение 3 минут. Аналогичным образом обрабатывалась и опытная проба. Для расчета активности СОД использовались показатели величины поглощения холостой и опытной проб.

Активность фермента выражали в условных единицах в мин на грамм белка (за единицу активности СОД принято 50% ингибирование реакции окисления адреналина).

### **2.12 Определение активности каталазы**

Принцип метода определения активности каталазы основан на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса не разрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония.

Готовили две пробы - холостую и опытную. Для этого в две пробирки наливали по 2 мл 0,03%-ного раствора пероксида водорода. Затем в опытную пробу вносили 0,01 мл лизата сперматозоидов, в холостую – 0,01 мл дистиллированной воды. Пробы перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. По завершении инкубации реакцию останавливали добавлением 1 мл 4%-ного раствора молибдата аммония.

Измеряли экстинкцию опытной и контрольной проб спектрофотометрически при длине волны 400 нм против дист.  $H_2O$  в кювете с толщиной слоя 1,0 см. Активность каталазы рассчитывали, используя коэффициент экстинкции пероксида водорода, равный  $22,2 \times 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и выражали в мккат разрушенной  $H_2O_2$  на грамм белка.

### **2.13 Определение содержания, восстановленного глутатиона**

Определение количества, восстановленного глутатиона основано на взаимодействии GSH с ДТНБК (5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной

кислотой) с образованием окрашенного в желтый цвет аниона "2-нитро-5-тиобензоата.

Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически при длине волны 412 нм.

К 0,2 мл спермиев приливали 1,8 мл дистиллированной воды. Для осаждения белков добавляли 3 мл осаждающего раствора, содержащего 1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г NaCl в 100 мл дист. воды. Пробы тщательно перемешивали стеклянной палочкой и после 20-минутного стояния центрифугировали 15 мин при 1700g. 1 мл супернатанта помещали в кювету с длиной оптического пути 10 мм, добавляли 4 мл 0,3 М фосфатного буфера и измеряли оптическую плотность. Затем в пробу вносили 0,5 мл раствора ДТНБК (0,01 г ДТНБК в 50 мл 1% раствора цитрата натрия). Пробу фотометрировали на СФ-46 при длине волны 412 нм. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабо-желтую окраску, параллельно с опытной пробой готовили контрольную, содержащую вместо супернатанта осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в соотношении 2:5. Содержание глутатиона рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК, и выражали в мкмолях на г белка.

#### **2.14 Определение активности глутатионпероксидазы**

Мерой активности ГПО являлась скорость окисления GSH в присутствии гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ). Концентрацию GSH до и после инкубации определяли спектрофотометрически. В основе развития цветной реакции лежит взаимодействие SH-группы GSH с ДТНБК с образованием окрашенного продукта - тионитрофенильного аниона (ТНФА). Количество последнего прямо пропорционально количеству SH-групп GSH, прореагировавших с ДТНБК.



Присутствие азидата натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в инкубате подавляет каталазную и псевдокаталазную активность в пробе и не влияет на активность ГПО. Инкубацию проводили в течение 5 мин, т.к. при более длительной инкубации исчезает линейная зависимость скорости окисления ГSH глутатионпероксидазой. Завершающим этапом анализа являлось спектрофотометрическое определение концентрации ГSH, израсходованного в процессе взаимодействия фермента и субстрата.

Сперматозоиды лизировали дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ , охлажденной до  $0^\circ\text{C}$ , в соотношении 1:20. 0,2 мл полученного раствора инкубировали с 0,73 мл 0,1 М Трис-НСI буфера, содержащего 78 мг  $\text{NaN}_3$  и 100 мг ГSH на 100 мл ( $\text{pH}=8,5$ ) в течение 10 мин при  $t = 37^\circ\text{C}$ , затем добавляли 0,07 мл 0,14% раствора ГПТБ и инкубировали 5 мин при той же температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл холодного 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, осажденные белки удаляли центрифугированием при 1700 g в течение 10 мин.

Затем 0,1 мл супернатанта вносили в 2,65 мл 0,1М Трис-НСI буфера ( $\text{pH}=8,5$ ) и добавляли 0,025 мл 0,4% раствора ДТНБК в метаноле. Через 5 мин, поместив пробу в кювету с длиной оптического пути 1,0 см, регистрировали изменение оптической плотности при  $\lambda = 412$  нм против дистиллированной воды. Активность фермента в сперматозоидах в мкмолях израсходованного в реакции ГSH, используя коэффициент молярной экстинкции  $13600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии ГSH с ДТНБК, и выражали в мкмолях в мин на г белка.

## 2.15 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между ГSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).



Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ).

Лизат сперматозоидов готовили добавлением двадцати объемов дистиллированной воды, охлажденной до 0° С. Далее в кювету с длиной оптического пути 1,0 см, содержащую 2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера рН 6,5, добавляли 0,2 мл 0,015 М раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл разведенного лизата. Реакцию инициировали внесением в кювету 0,2 мл 0,015 М ХДНБ (готовили на метаноле).

Регистрацию оптической плотности проводили при  $t=25^{\circ}\text{C}$  и длине волны 340 нм против воздуха сразу после перемешивания в течение трех минут. Полученные значения оптической плотности использовали при вычислении активности GST. Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ при длине волны 340 нм, равный  $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , и выражали в мкмолях образующихся глутатион-S-конъюгатов в мин на грамм белка.

## **2.16 Статистическая обработка результатов**

Для обработки данных полученных результатов использовали программы Statistica 8 и MicrosoftOfficeExcel 2013 в Windows10. Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы, интервального разброса (С25-С75 процентели). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни.

### **3 Результаты и обсуждение**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## **Заключение**

1. У пациентов с олигозооспермией достоверно по сравнению с контролем и показателями 2 группы снижены концентрация и количество прогрессивных и подвижных сперматозоидов.

2. Уровень ДНК фрагментации не отличается у пациентов второй и третьей группы, но значительно повышен по сравнению с показателем в контрольной группе и коррелирует с числом дефектов головки сперматозоидов.

3. Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида превышает контрольный показатель во 2-й и 3-й группах из-за угнетения глутатионовой системы и дисбаланса активности тандема ферментов супероксиддисмутаза/каталаза.

## Список использованных источников

1. P. Nandi A PRELIMINARY STUDY ON HEAVY METALS (LEAD, CADMIUM AND ARSENIC) IN FOLLICULAR FLUID AND ITS EFFECT ON OOCYTE, EMBRYO QUALITY AND OUTCOME OF IVF TREATMENT. P./ Nandi, S. K. Banerjee, S. Basu, M. C. Das, // Department of Environmental Science – October 18, 2011
2. David S., Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men/ David S. Guzick, M.D., Ph.D., James W. Overstreet, M.D.,// National Cooperative Reproductive Medicine Network – November 8, 2001
3. Q. V. NERI, Intracytoplasmic sperm injection/ Q. V. NERI, N. TANAKA, A. WANG,// MINERVA GINECOL – 2004
4. A. Jungwirth, Male Infertility. EAU Guidelines/ A. Jungwirth (Chair), T. Diemer (Vice-chair), Z. Kopa, // European Association of Urology – November 2017
5. Jonathan Jarow, Optimal Evaluation of the Infertile Male/ Jonathan Jarow, MD, Chairman; Mark Sigman, MD, Facilitator; // American Urological Association – 2017
6. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // Сорос. общеобразоват. журн. – 1999. – №1. – С.2–7
7. Зайцев, В. Г. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / В. Г. Зайцев // Вестн. Волгоградск. мед. академии. – 1998. – №4. – С.49–53.
8. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соросовский общеобразовательный журнал. – 2000. – №12. – С.13–19
9. Сазонтова, Т. Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т. Г. Сазонтова, Ю.

В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – С.2–18.

10. Шанин, Ю. Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике / Ю. Н. Шанин, В. Ю. Шанин, Е. В. Зиновьев // СПб.: ЭЛБИ-СПб. – 2003. – С.128.

11. Рязанцева, Н. В. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – С.710–718.

12. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов, В.Н. Крутько // Информатика здоровья и долголетия: Сборник трудов ИСА РАН. М.: УРСС. – 2006. – С.85–96.

13. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Мед. пресса. – 2006. – 400 с

14. Roberts, A. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) mediates hypoxic relaxation of bovine coronary arterial strips. / A. Roberts, E. Messina, G. Kaley // Prostaglandins. – 2009. – P. 555–69

15. Nurşen Başaran, Evaluation of oxidative stress and immune parameters of boron exposed males and females / Nurşen Başarana, Yalçın Duydub, Merve Bacanlı // Food and Chemical Toxicology. – 2020. – №142

16. Северин, Е. С. Биохимия / Е. С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД. – 2014

17. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям / Н. М. Титова и [др.]. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009.– С.10, 18.

18. Хамадьянова, А.У/Роль свободнорадикального окисления в патогенезе воспалительных заболеваний органов малого таза и возможность

фармакологической коррекции / Хамадьянова А.У // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т.11, №6(66) С.35– 39

19. Лифшиц, В.М. Биохимические анализы в клинике / В.М Лифшиц, В.И. Сидельникова // – 2001. – С.234.

20. Carmen Peña-Bautista, Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers / Carmen Peña-Bautista, Miguel Baquero, Máximo Vento // Clinica Chimica Acta. – 2019. – №491. – P. 85-90.

21. Tatiele C. do Nascimento. Microalgae carotenoids intake: Influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and antioxidant enzymes / Tatiele C. do Nascimento, Pricila P. Nass, Andrêssa S. Fernandes // Food Research International. – 2020. – №128. – P.105.

22. Etsuo Niki, Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? / Etsuo Niki // FEBS Letters. – 2012. – V. 586. – №21. – P. 3767-3770.

23. Maiza Lacerda Barbosa, Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers / Maiza Lacerda Barbosa, Ag-Anne Pereira Melode Meneses, Rai Pablo Sousade Aguiar // Neurology, Psychiatry and Brain Research. – №36. – 65-72.

24. Чанаева, Е. А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека / Е. А. Чанаева, Р. И. Айзман, А. Д. Герасев – //Экология человека – 2013.

25. Нехороший А. А., Шустанова Т. А., Буриков А. А. и др. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная система в реализации восстановительной функции сна // Физиология человека. - 2009. - Т. 35, № 4. - С. 71–75.

26. Кольтовер В. К. Свободнорадикальная теория старения и антиоксиданты: теоретико-надежностный аудит // Биологические механизмы старения. Харьков, 2006. С. 8–9.

27. Шанина Ю. Н., Шанин В. Ю., Зиновьев Е. В. Антиоксидантная терапия в клинической практике. СПб. : Элби-СПб, - 2003. - 128 с.

28. Клиническая биохимия : классический университетский учебник / под. ред. В.А. Ткачука. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 512 с. 2
29. Wolgemuth, DJ. Genetic control of mitosis, meiosis and cellular differentiation during mammalian spermatogenesis / DJ. Wolgemuth, K. Rhee, S. Wu, SE. Ravnik // Fertil. Reprod. Dev.- 1995.-Vol. 7.-P. 669-683.
30. Tramer, F. Native specific activity of glutathione peroxidase (GPx1), phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and glutathione reductase (GR) does not differ between normo- and hypomotile human sperm samples / F. Tramer., L. Caponecchia, P. Sgro, M. Martinelli et al // Int. J. Androl.- 2004.-Vol.27.-P.88-93.
31. Tavilani, H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters / H. Tavilani, M. Doosti, H. Saeidi // Clinica Acta.- 2005.-Vol. 356.-P. 199-203.
32. Saleh, R.A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Review Article / R.A. Saleh and A. Agarwal // J. Androl.-2002.-Vol. 23.-P. 737-752.
33. Paasch, U. Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa / U. Paasch, A. Agarwal, S. Gupta, RK. Sharma et al.// Ann. N.Y. Acad. Sci.-2003.-Vol. 1010.-P. 486-488.
34. Poveri, A. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in sperm / A. Poveri, L. Flohe, M. Maiorino, F. Ursini // Meth. Enzymol.- 2002.-Vol. 347.-P. 208-212.
35. Said, TM. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility / TM. Said, A. Agarwal, RK. Sharma, E. Mascha et al. // Fertil. Steril.-2004.-Vol. 82.-P.871-877.
36. Kirkman, H. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries / H. Kirkman, G. Gaetani // TRENDS in Biochem. Sci.- 2006.-Vol. 32.-№1.-P. 44-50.



37. L. Simon, Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance/ L. Simon, K. I. Aston, B. R. Emery// Journal Citation Reports: 6/8 (Andrology) – 2020
38. Denny Sakkas, Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa/ Denny Sakkas, Ewa Mariethoz, Giancarlo Manicardi// Reviews of Reproduction (1999) 4, 31–3
39. Denny Sakkas, Relationship between the Presence of Endogenous Nicks and Sperm Chromatin Packaging in Maturing and Fertilizing Mouse Spermatozoa/ Denny Sakkas, Giancarlo Manicardi, Patrizia Grace Bianchi// Biology of Reproduction – 2018
40. Ralf Henkel, Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients/ Ralf Henkel, Eva Kierspel, Thomas Stalf Ph.D// Fertility and Sterility – March 2005, Pages 635-642
41. Rakesh K. Role of reactive oxygen species in male infertility/ Rakesh K.Sharma, Ashok Agarwal// Urology – 2017, Pages 835-850
42. Ashok Agarwal, The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility/ Ashok Agarwal, Chak-Lam Cho, Ahmad Majzoub// Transl Androl Urol v.6(Suppl 4) – 2017
43. R. Henkel, TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage/ R. Henkel, C. F. Hoogendijk, P. J. D. Bouic// First international journal of andrology – 2010 Pages 305-313
44. Agarwal, Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation?/ Agarwal, Ashok; Cho, Chak-Lam// FERTILITY, IVF AND REPRODUCTIVE GENETICS: EDITED BY EMRE SELI AND JUAN ANTONIO GARCÍA VELASCO – 2016 - Volume 28 - Issue 3 - p 164-171
45. Evangelini Evgeni, Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population/ Evangelini Evgeni,

George Lymberopoulos, Maria Gazouli// European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Volume 188 – 2015, Pages 17-23

46. Ramadan A Saleh, Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study/ Ramadan ASalen, Ashok Agarwal, David Nelson// Fertility and Sterility Volume 78, Issue 2 – 2002, Pages 313-318

47. Germaine M.Buck Louis, Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study/Germaine M.Buck Louis, Rajeshwari Sundaram, Enrique F.Schisterman// Fertility and Sterility Volume 101, Issue 2 – 2014, Pages 453-462

48. Lynne Robinson, The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis/ Lynne Robinson, Ioannis D. Gallos, Sarah J. Conner// Human reproduction – 2012, Pages 2908–2917

49. N. Khadem, Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions/ N. Khadem, A. Poorhoseyni, M. Jalali// First international journal of andrology – 2014 Pages 126-130

50. M. Enciso, Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities/ M. Enciso, S. Alfarawati, D. Wells// Human Reproduction, – 2013, Pages 1707–1715

51. Ranjith Ramasamy, Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss/Ranjith Ramasamy, Jason M.ScovellB.A, Jason R.Kovac//Fertility and Sterility – 2015, Pages 906-909

52. Ermanno Greco, ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment/Ermanno Greco, Stefania Romano, Marcello Iacobelli//Human Reproduction – 2005, Pages 2590–2594

53. Ozlem Tunc, Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy/ Ozlem Tunc, Jeremy Thompson, Kelton Tremellen// Reproductive BioMedicine Online – 2009, Pages 761-768

54. Yves JRMénézo, Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect/Yves JR Ménézo, André Hazout, Gilles Panteix// Reproductive BioMedicine Online – 2007, Pages 418-421
55. Juan Carlos Martínez, Dietary supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves seminal antioxidant status and decreases sperm DNA fragmentation/Juan Carlos Martínez-Soto, Joan Carles Domingo// Journal Systems Biology in Reproductive Medicine – 2016
56. C. Abad, Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA/C. Abad, M. J. Amengual, J. Gosálvez// First international journal of andrology – 2013, Pages 211-216
57. Marian G Showell, Antioxidants for male subfertility/ Marian G Showell, Rebecca Mackenzie-Proctor, Julie Brown// Cochrane Systematic Review - 2014
58. Armand Zini, Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation?/ArmandZini, Gert Dohle// Fertility and Sterility – 2011, Pages 1283-1287
59. Ying-JunWang, Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis/ Ying-JunWang, Rong-Qiu Zhang, Yan-JunLin// Reproductive BioMedicine Online – 2012, Pages 307-314
60. Marij Smit, Decreased Sperm DNA Fragmentation After Surgical Varicocelectomy is Associated With Increased Pregnancy Rate/ Marij Smit, Johannes C. Romijn, Mark F. Wildhagen// American Urological Association – 2010, Page: 270-274
61. Tsung-Hsien Lee, Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility/ Tsung-Hsien Lee, Chung-Hsien Liu, Yang-Tse Shih// Human Reproduction– 2010, Pages 839–846
62. I. Hammoud, Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high

sperm DNA fragmentation rates/ I. Hammoud, F. Boitrelle, F. Ferfour// American Urological Association – 2012

63. R. Maettner, Quality of human spermatozoa: relationship between high-magnification sperm morphology and DNA integrity/ R. Maettner, K. Sterzik, V. Isachenko// First international journal of andrology – 2014, Pages 547-555

64. Rashki Ghaleno L, Hyaluronic Acid Binding Assay Is Highly Sensitive to Select Human Spermatozoa with Good Progressive Motility, Morphology, and Nuclear Maturity/ Rashki Ghaleno L., Rezazadeh Valojerdi M., Chehrazi M// Gynecologic and Obstetric Investigation – 2016

65. C. K. Bradley, Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis/ C. K. Bradley, S. J. McArthur, A. J. Gee// First international journal of andrology – 2016, Pages 903-910

66. Armand Zini, Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing/ Armand Zini, Robert Knam, Victor Mak// Fertility and Sterility – 2000, Pages 824-827

67. Akanksha Mehta, Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia/ Akanksha Mehta, Alexander Bolyakov, Peter N. Schlegel// Fertility and Sterility – 2015, Pages 1382-1387

68. M. Arafa, ICSI outcome in patients with high DNA fragmentation: Testicular versus ejaculated spermatozoa/ M. Arafa, A. AlMalki, M. AlBadr// First international journal of andrology – 2017

69. Ashok Agarwal, Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios/ Ashok Agarwal, Ahmad Majzoub, Sandro C. Esteves// Transl Androl Urol v.5(6) – 2016

70. Kai Ni, Sperm Protamine mRNA Ratio and DNA Fragmentation Index Represent Reliable Clinical Biomarkers for Men with Varicocele after Microsurgical Varicocele Ligation/ Kai Ni, Klaus Steger, Hao Yang// First international journal of andrology – 2014, Page: 170-176

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е.И.Шишацкая

« 13 » июля 2020 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Особенности морфо-функциональных характеристик эякулята  
при различных видах патоспермии

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный

руководитель  08.07.2020

доцент, к.б.н. Н.М. Титова

Выпускник  08.07.2020

А.Е. Курченко

Рецензент  10.07.2020

доцент, к.б.н. Р.Н. Белоногов

Красноярск 2020