

**Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»**

**Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
кафедра генетики**

Белицкая Юлия Сергеевна

**АССОЦИАЦИЯ SNP ГЕНОВ ФАКТОРОВ ИММУННОЙ И
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ С НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
по направлению 06.04.01 - Биология**

**Научный руководитель
Профессор кафедры генетики
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, д.б.н.
Машкина Елена Владимировна**

**Рецензент
С.н.с научно-исследовательской лаборатории "Биомедицина"
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, к.б.н
Покудина Инна Олеговна**

Ростов-на-Дону – 2019

РЕФЕРАТ

Объем работы - 61 страница, 12 рисунков, 12 таблиц, 59 использованных источников литературы.

ГЕНЫ АНТИОКСИДАНТОВ, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, АСТЕНОЗООСПЕРМИЯ, ОЛИГОЗООСПЕРМИЯ, ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, ЦИТОКИНЫ, *TNF- α* , *PON1*, *IL6*

Целью данной работы было изучить ассоциацию полиморфизма генов антиоксидантов, а также генов цитокинов с нарушениями сперматогенеза.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эякулята 150 мужчин. В результате анализа анамнеза обследованных мужчин, а также результатов исследования эякулята мужчины были поделены на 4 группы в зависимости от показателей спермограммы – 41 образец с астенозооспермией, 37 образцов - с олигозооспермией, 24 образца – с астенотератозооспермией и 48 образцов составили контрольную группу.

Для выделения ДНК из эякулята использовали набор реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ». Полиморфизмы $-308G>A$ гена *TNF- α* , $-174G>C$ гена *IL6*, *Gln192Arg* гена *PON1* исследовали с использованием набора реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального гель-электрофореза в 3 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе GelDox (BioRad).

В ходе исследования были выявлены статистически значимые различия в частотах аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF- α* среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группой. Для аллели $-308G$ выявлена ассоциация с повышенным относительным риском развития олигозооспермии ($p=0,04$; OR=2,41; CI 1.10 - 5.27), а также была выявлена тенденция к статистически значимым различиям в распределении частот аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF- α* для мужчин с астенотератозооспермией по сравнению с контрольной группой ($p=0,07$). При

анализе межгенного взаимодействия исследуемых локусов выявлен генотип высокого риска развития астенотератозооспермии (OR=5,0 (1,13 –22,19; p=0,059, $\chi^2=3,57$)): *-308GG TNF-a / -174GG IL6 / Gln192Gln PON1*. Повышенный риск развития олигозооспермии выявлен для генотипа *-308GG TNF-a / -174GC IL6 / Gln192Gln PON1* (p=0,077, $\chi^2=3,12$; OR=4,14 CI 1,01–6,18).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ - адренокортикотропный гормон

АОС – антиоксидантная система организма

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМБ – идиопатическое мужское бесплодие

ОС – окислительный стресс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СТГ – соматотропин

ФНО- α (TNF- α) – фактор некроза опухоли альфа

САТ – каталаза

IL – ИНТЕРЛЕЙКИНЫ (ИЛ)

IFN – интерфероны

G-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GPX- глутатионпероксидаза

PRX – пероксиредоксин

SDF-1 α – фактор стромальных клеток 1-альфа

SOD – супероксиддисмутаза

TGF - трансформирующий фактора роста

TRX – тиоредоксин

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФФЕРАТ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Общая характеристика цитокинов	8
1.2 Взаимосвязь цитокинов с процессом сперматогенеза	11
1.3 Активные формы кислорода и сперматогенез	14
1.4 Антиоксидантная система сперматозоидов.....	17
1.5 Связь цитокинов с окислительным стрессом	21
2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1 Материал исследования.....	26
2.2 Методы исследования.....	26
2.2.1 Выделение ДНК сорбентным методом.....	26
2.2.2 Анализ полиморфизма в генах методом аллель-специфичной ПЦР	28
2.2.3 Анализ продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза	29
2.3.3 Методы статистического анализа	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму <i>Gln192Arg</i> гена <i>PON1</i>	33
3.2 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму <i>-174G>C</i> гена <i>IL6</i>	37
3.3 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму <i>-308G>A</i> гена <i>TNF-α</i>	41
3.4 Анализ межгенного взаимодействия генов иммунной регуляции и антиоксидантов при нарушениях сперматогенеза	45
ВЫВОДЫ.....	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

В России сохраняется один из самых высоких показателей семейного бесплодия, достигающий примерно 19–20 % от общего количества супружеских пар. В Европе данный показатель составляет около 15 %. Данная ситуация может привести к сокращению численности населения страны в ближайшие десятилетия, именно поэтому проблемы репродуктивного здоровья населения имеют актуальность на данный момент (Калинченко, Тюзиков, 2017). На протяжении многих лет считалось, что бесплодие в большей степени связано с проблемами в репродуктивной системе женщины, однако современные исследования показали, что мужской фактор имеет не менее значимую роль (Долгушина, Глинкина, 2015). В настоящий момент вклад мужского фактора в структуру семейного бесплодия достигает около 50 %.

В числе причин мужского бесплодия рассматриваются (Тавокина, 2014):

1. эндокринные расстройства;
2. иммунологический фактор;
3. нарушения сперматогенеза;
4. факторы внешней среды и т.д.

В настоящее время актуально проводить изучение генетических факторов мужского бесплодия, так как по данным исследований известно, что генетические факторы обуславливают около 30-50 % всех случаев тяжелых форм бесплодия у мужчин (Тавокина, 2014). Сперматогенез является очень сложным биологическим процессом, который регулируется каскадом активации и деактивации определенных генов. В результате работы этих генов происходит процесс созревания сперматозоидов из клеток-предшественников. У человека в процесс регуляции сперматогенеза вовлечено более 2000 генов. По причине генетических нарушений могут возникнуть разные по своей этиологии и степени тяжести формы бесплодия:

от незначительных нарушений сперматогенеза до полной дисфункции гонад (Тавокина, 2014). Среди генетических факторов мужского бесплодия выделяются три основные:

1. хромосомные aberrации;
2. генные мутации;
3. дисперсия хроматина и фрагментация ДНК.

Широко распространенные в геноме человека точечные замены одного нуклеотида в цепи ДНК (SNP), как правило, не являются непосредственной и обязательной причиной развития патологического процесса, однако они могут обуславливать больший или меньший риск его развития при действии различных факторов. Именно поэтому при мужском бесплодии актуально применять молекулярно-генетические методы, благодаря которому возможно произвести оценку состояния генетического аппарата у мужчин (Тавокина, 2014).

Таким образом, целью данной работы было изучить ассоциацию полиморфизма генов антиоксидантов, а также генов цитокинов с нарушениями сперматогенеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. исследовать ассоциацию полиморфизма $-308G>A$ гена *TNF- α* с нарушениями сперматогенеза;
2. исследовать ассоциацию полиморфизма *Gln192Arg* гена *PON1* с нарушениями сперматогенеза;
3. исследовать ассоциацию полиморфизма $-174G>C$ гена *IL6* с нарушениями сперматогенеза;
4. провести анализ межгенных взаимодействий аллельных вариантов генов *PON1*, *IL6*, *TNF- α* при нарушениях сперматогенеза.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика цитокинов

Цитокины – это биологически активные вещества пептидной природы, которые регулируют широкий спектр процессов, протекающих в организме. Термин «цитокины» ввел N.Cohen в 1974 г., и считалось, что они вырабатываются клетками иммунной системы, являясь одновременно и ее регуляторами. Однако в последние десятилетия появились данные, что продуцентами цитокинов могут быть и эндотелиальные клетки, при этом вырабатываемые ими цитокины также участвуют в регуляции процессов гемопоза, хемотаксиса лейкоцитов, дифференцировки иммунокомпетентных клеток, синтезе острофазных белков. Цитокины могут быть как в секретируемой, так и мембранно-связанной формах, а их действие может осуществляться как внеклеточным – «паракринным», так и внутриклеточным «аутокринным» путём через клеточные рецепторы (Кадагидзе, 2003).

Главными функциями цитокинов являются: (Кадагидзе, 2003):

- регуляция гемопоза;
- регуляция иммунного ответа и воспалительных процессов;
- участие в ангиогенезе, апоптозе, хемотаксисе, эмбриогенезе.

Цитокины обеспечивают метаболический гомеостаз и являются трансммиттерами межклеточного взаимодействия. Процессы их синтеза и секреции происходят постоянно. В малых концентрациях цитокины обладают широким спектром полезных свойств. Они являются межклеточным языком, который позволяет клеткам общаться и взаимодействовать между собой (Межирова и др., 2011).

Биологический эффект цитокинов реализуется посредством рецепторных молекул, локализованных на цитоплазматической мембране всех клеток организма, кроме эритроцитов. Наличие общих структур в рецепторах может обуславливать функциональное сходство ряда цитокинов (Межирова и др., 2011).

Цитокиновая система включает в себя 5 классов, которые подразделяются по их биологическому действию (Орадова и др., 2015):

1. интерлейкины - секреторные регуляторные белки иммунной системы, которые обеспечивают медиаторное взаимодействие в иммунной системе и связь ее с другими системами в организме;

2. интерфероны – это противовирусные белки, обладающие иммунорегуляторным и противоопухолевым действием;

3. факторы некроза опухоли (ФНО) - цитокины с цитотоксическим и регуляторным действием;

4. хемокины – являются хемоаттрактантами для лейкоцитов;

5. колониестимулирующие факторы – являются стимуляторами роста и дифференцировки гемопоэтических клеток.

Также цитокины подразделяются на провоспалительные и противовоспалительные.

Противовоспалительные цитокины оказывают противодействие системному воспалению в организме. Они участвуют в подавлении синтеза провоспалительных цитокинов. Среди них доминируют такие, которые снижают иммунный ответ. Они угнетают синтез истинных рецепторов к провоспалительным цитокинам, стимулируют выработку ферментов, которые отщепляют внеклеточные домены мембранных рецепторов, а также увеличивают продукцию мембранных рецепторов, которые не способны передать какой-либо сигнал внутрь клетки (ингибиторы цитокинов). При этом активация генов, отвечающих за производство противовоспалительных цитокинов, осуществляется провоспалительными цитокинами (Межирова и др., 2011).

Провоспалительные цитокины регулируют воспалительные изменения в макроорганизме, вызываемые патогенными микроорганизмами, вирусами или аутоиммунными процессами. Провоспалительные цитокины оказывают воздействие на гипоталамические и гипофизарные центры,

вызывают лихорадку, медленноволновой сон, анорексию, усиливают пролиферацию глии, повышают секрецию ряда нейропептидов (включая эндорфины), кортикотропин-релизинг фактора, АКТГ, СТГ, лютеотропного гормона, пролактина. Имеются данные, что провоспалительные цитокины избирательно активируют симпатическую нервную систему в селезенке, почечной ткани, гипоталамусе, что является необходимым условием для развития острофазовых реакций. Цитокины могут оказывать прямое действие на надпочечники, повышая, таким образом, содержание кортикостероидов в крови (Колпаков, Афанасьев, 2003).

В нашем исследовании мы рассмотрим связь провоспалительных цитокинов с патологией сперматогенеза.

Ген *IL6* локализован на 7p21 хромосоме. Данный ген кодирует белок интерлейкин-6, являющийся одним из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции (Никулина С. Ю. и др., 2016). Генетическим маркером гена *IL6* является полиморфизм, в результате которого происходит замена гуанина (G) на цитозин (C) в позиции -174 (-174G>C). Данный полиморфизм влияет на уровень экспрессии гена, изменяя скорость его транскрипции (Коненков и др., 2017).

Интерлейкин 6 – гликопротеин с молекулярной массой 20–30кДа, синтезируется мононуклеарными фагоцитами, фибробластами, лимфоцитами, гепатоцитами, эндотелиальными, мезангиальными и другими клетками. Индукторами выработки ИЛ-6 являются ИЛ-1, ФНО- α , интерфероны, колониестимулирующие факторы, бактериальные продукты, митогены. ИЛ-6 является сильным провоспалительным цитокином, как и ИЛ-1 и ФНО, но продуцируется позже последних, ингибирует их образование, относится к цитокинам, завершающим развитие воспалительной реакции. Известно, что ИЛ-6 обладает большим влиянием на регуляцию иммунного ответа: он обеспечивает стимуляцию и пролиферацию, а также

дифференцировку В-клеток, усиливает антителообразование, а также участвует в продукции мультипотентных колониобразующих факторов и мегакариоцитов, может подавлять апоптоз нейтрофилов, которые обладают высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, стимулирует гепатоциты к синтезу различных белков плазмы (Кадагидзе, 2003).

Ген фактора некроза опухолей альфа (*TNF- α*) расположен на 6-й хромосоме в высоко вариабельном участке генома бр21.3 и в регуляторной области имеет ряд однонуклеотидных замен (Гагулин и др., 2018), состоит из 3 т.п.н. и содержит 4 экзона. Наибольший интерес представляет замена гуанина на аденин в позиции -308G>A (rs1800629), которая влияет на уровень продукции белка (Гагулин и др., 2018). Ген *TNF- α* кодирует провоспалительный цитокин (**ФНО**), который секретируется, в основном, макрофагами, что позволяет ему участвовать в процессе клеточной пролиферации, дифференцировке, апоптозе, обмене липидов, свертываемости, резистентности к инсулину, и эндотелиальной функции.

ФНО синтезируется как мембранный белок с молекулярной массой 26кДа (233 аминокислоты). После воздействия специфической металлопротеазы, а именно ФНО-конвертирующего фермента (ADAM17), мембрано-связывающий фрагмент отщепляется и образуется растворимый ФНО с молекулярной массой 17 кДа (157 аминокислот). Активной формой белка является гомотример, теряющий активность при диссоциации субъединиц, так как только тример способен связываться с рецептором и олигомеризовать его, что необходимо для запуска сигнального пути.

1.2 Взаимосвязь цитокинов с процессом сперматогенеза

В настоящее время доказано, что функционирование репродуктивной системы как у мужчин, так и у женщин осуществляется при тесном

взаимодействии цитокин-опосредованных и клеточно-опосредованных механизмов (Айзикович и др., 2010).

Огромное значение в поддержании структурно-функциональной целостности и активности сперматозоидов отводится механизмам иммунной регуляции и, в первую очередь, цитокинам (Останин и др., 2006). Цитокины принимают участие как в регуляции репродуктивных процессов, так и в гуморальном контроле сперматогенеза. Цитокины различных семейств интегрированы в многоуровневую систему регуляции развития и функционирования экзо- и эндокринного аппарата яичек, клеток Сертоли, тестикулярных макрофагов (Галимов и др., 2012).

Большинство известных цитокинов экспрессируется в зрелом яичке даже при отсутствии воспаления или активации иммунных процессов. Противовоспалительные цитокины такие как - IL-4, IL-10 и пептиды семейства трансформирующего фактора роста TGF, transforming growth factor, наряду с их функциональными антагонистами IL-1, IL-6, TNF α (tumor necrosis factor-alpha) участвуют в процессах дифференцировки сперматогенных клеток, а также синтеза андрогенов. Поэтому инициирование экспрессии цитокинов различными агентами при патологических состояниях сопровождается изменениями скорости стероидо- и сперматогенеза. А также, в сперме обнаружены высокие концентрации некоторых хемокинов, например фактора стромальных клеток SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 alpha), который играет роль в инициации сперматогенеза и взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки (Галимов и др., 2012).

Показано, что IFN γ и TNF α агрессивно влияют на подвижность сперматозоидов, а уровень IL-6 и IL-8 тесно коррелирует с количеством лейкоцитов в эякуляте. Обнаружено, что цитокины, оказывая воздействие на клетки Лейдига и Сертоли, способны влиять на уровень тестостерона в организме (Айзикович и др., 2008).

Также установлено, что пролактин может вызывать активацию опосредованного макрофагами яичка синтеза TNF- α и, как следствие, уменьшение наработки стимулируемого гонадотропином тестостерона клетками Лейдига. Увеличение уровня тестостерона усиливает клеточный иммунитет, поэтому можно предположить, что не только локально синтезируемые цитокины, но и цитокины из общего сосудистого русла способны проявлять свои эффекты на тестикулярном уровне, о чем свидетельствуют факты активного участия цитокинов в формировании гамет и регуляции сперматогенеза, а также их вклада в иммуносупрессию семенной плазмы (Айзикович и др., 2010).

Устинов Д.В. с коллегами провели исследование, целью которого было изучить цитокиновый профиль спермальной плазмы у мужчин с нарушением репродуктивной функции. В исследовании приняло участие 125 мужчин в возрасте от 24 до 46 лет, состоящих в бесплодном браке, контрольная группа (n=38) была составлена из мужчин аналогичного возраста, состоящих длительное время в браке и имеющих здоровых детей. В результате исследования было выявлено, что изменения цитокинового профиля спермальной плазмы при патоспермии проявлялись увеличением уровня провоспалительных медиаторов и хемокинов в сочетании с дефицитом IL-7. У мужчин даже при отсутствии каких-либо клинических или лабораторных симптомов урогенитальной инфекции при проведении спермиологического исследования были обнаружены признаки «латентного» воспалительного процесса в мужском репродуктивном тракте. К таковым маркерам относят высокие концентрации IL-1 β / α , TNF- α , IL-6, IL-8, G-CSF. Кроме того, по данным исследования были выявлены тесные корреляционные связи уровня G-CSF и IL-7 в спермальной плазме с морфологией и подвижностью сперматозоидов соответственно. В данном исследовании мужчины с нормоспермией и патоспермией статистически значимо различались не только по уровню цитокинов, но и по способности сперматозоидов к

оплодотворению *in vitro* (Устинов и др. 2014). Данные аспекты указывают на важную роль цитокинов в процессе регуляции сперматогенеза. В результате данного исследования был сделан вывод, что нарушения цитокинового профиля спермы являются патогенетической основой так называемого «идиопатического» мужского бесплодия, когда не удается обнаружить каких-либо явных андрологических дефектов в виде гипотрофии/гипоплазии яичек, эндокриннопатии, варикоцеле, хронического простатита и т.д., а обычные, рутинные показатели спермограмм сохраняются в границах нормы (Устинов и др. 2014).

1.3 Активные формы кислорода и сперматогенез

Окислительный стресс (ОС) - это состояние клетки, при котором нарушена регуляция динамического равновесия про- и антиоксидантой систем, ситуация, когда свободные радикалы инициируют неконтролируемые процессы окисления биополимеров, которые приводят к деструкции биохимических и физиологических функций отдельных систем целостного организма. Окислительный стресс определяется как нарушение равновесия между повреждениями, индуцированными свободными радикалами, и защитой, обеспечиваемой антиоксидантами (Ломтева и др., 2015).

АФК могут вызывать нарушения целостности сперматозоида, а также нарушение структуры ДНК (рис. 1), такие как разрыв цепей ДНК, хромосомные перестройки и генные мутации (Мещеряков и др., 2016).

Высокая чувствительность сперматозоидов к воздействию АФК может объясняться высоким содержанием в их мембранах жирных кислот (Lewis, 1997). В результате процесса окисления жирных кислот может происходить повреждение сперматозоидов за счет нарушения целостности и проницаемости их мембран (Suleiman, 1996). А также апоптоз клеток и нарушение целостности ДНК могут возникать в сперматиде и

предшественниках сперматозоидов на ранних стадиях сперматогенеза (Fisher, 1997).

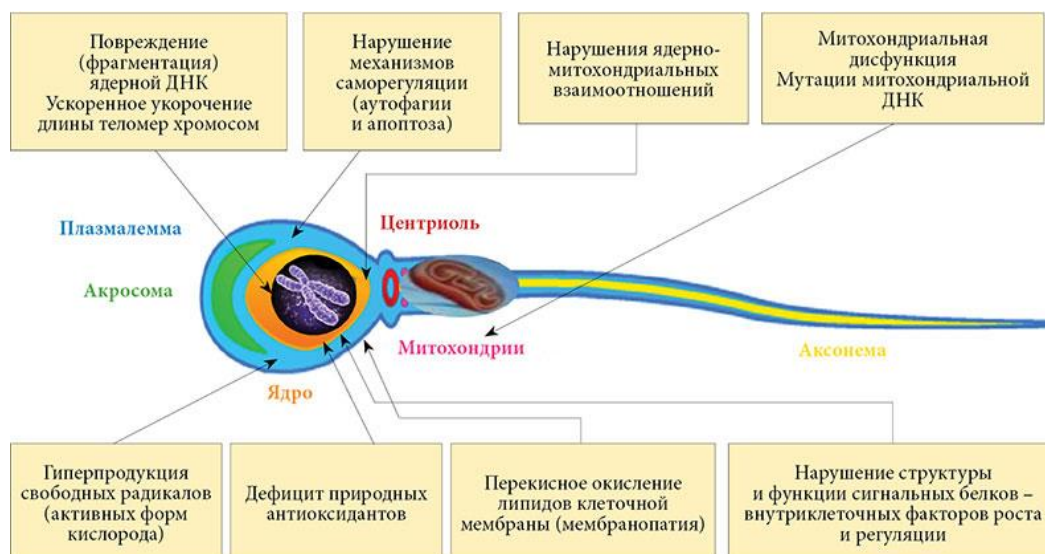


Рисунок 1- Основные клеточно-молекулярные механизмы патологического окислительного стресса сперматозоидов (Калинченко, Тюзиков, 2017)

Основными источниками гиперпродукции АФК в сперме являются лейкоциты и незрелые сперматозоиды (рис.2) (Ломтева, Шкурат и др., 2015). С ранних стадий сперматогенеза в сперматогониях возможно образование небольшого количества свободных радикалов. По данным исследований известно, что сперматозоиды с остаточным избытком цитоплазмы, которая указывает на незрелость и пониженную фертильность, продуцируют большее количество свободных радикалов, чем сперматозоиды с нормальной морфологией. Поврежденные сперматозоиды не могут самостоятельно устранить повреждение, так как их цитоплазма содержит недостаточно ферментов антиоксидантной системы (АОС) (Ломтева и др., 2015). В случае, когда образование свободных радикалов превышает содержание антиоксидантов, развивается ОС.

R. Jones в 1979 году с соавторами описали патологические процессы, лежащие в основе способности свободных радикалов продуцировать

функциональные изменения сперматозоидов, заключающиеся в снижении их активности (Jones et al., 1979).



Рисунок 2 – Схема влияния АФК на сперматогенез (Ломтева и др., 2015)

Имеются данные литературы о влиянии АФК на ДНК сперматозоидов. Так, по данным исследования французских ученых АФК могут повреждать ДНК непосредственно путем образования окисленных ДНК-продуктов (например, 8-оксо-dG, 1, N6-ethenoadenosine, 1, N6-ethenoguanosine), что приводит к образованию сайтов, дестабилизирующих структуру ДНК и являются причиной последующих односторонних разрывов (Badouard et al., 2008).

Повышение концентрации активных форм кислорода может происходить при действии ряда экзогенных факторов, в частности полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Имеются данные литературы о влиянии полициклических ароматических углеводородов на качество спермы и целостность ДНК сперматозоидов. В исследовании приняло участие 106 человек, работающих на заводе и контактирующих по роду профессиональной деятельности с ПАУ. Мужчины были поделены на две группы - с высоким воздействием ПАУ и низким. Оценивали качество

спермы, состояние окислительного стресса и повреждение ДНК сперматозоидов (фрагментация и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин). В группе с высоким воздействием подвижность сперматозоидов и их количество с нормальной морфологией были значительно ниже, чем в контрольной группе ($P = 0,046$ и $0,049$ соответственно). Группа с высоким воздействием ПАУ также имела значительно более высокие концентрации 8-оксоGuo в сперме, чем в контрольной группе ($P = 0,027$). Таким образом, авторы пришли к выводу, что окислительный стресс, вызванный воздействием ПАУ, был связан со снижением качества спермы (Jeng et al., 2018).

1.4 Антиоксидантная система сперматозоидов

Антиоксидантная система определяет антиоксидантную емкость клеток, тканей и биологических жидкостей. Антиоксиданты, которые входят в состав семенной жидкости, играют важную роль в защите сперматозоидов от окислительного влияния (Кидун, Угольник, 2013). Семенная жидкость является источником антиоксидантов и играет важную роль в защите сперматозоидов от окислительного повреждения. Это особенно важно, поскольку сперматозоиды имеют мало цитоплазмы (антиоксидантные ферменты обычно внутриклеточные), практически не обладают способностью к синтезу белка и низкой антиоксидантной способностью (Zini, 1993). Эндогенные ферменты, инактивирующие свободные радикалы, в мужском репродуктивном тракте включают супероксиддисмутазу (SOD), каталазу и глутатионпероксидазу (GPX) (Jow, 1993; Zini et al., 1996; Zini, 1997; Zini, Schlegel, 1997). Эти же антиоксидантные ферменты (SOD, каталаза и GPX) обнаружены в сперме. Антиокислительная емкость семенной плазмы больше, чем плазмы крови. Но на протяжении процесса сперматогенеза и в период нахождения сперматозоидов в придатках яичка они не контактируют с антиоксидантами семенной плазмы и функцию защиты сперматозоидов выполняют антиоксиданты яичка, придатка, а также

их собственная антиокислительная способность. Поэтому сперматозоиды достаточно уязвимы при прохождении через придатки яичек, особенно при наличии воспалительных процессов (Божедомов и др., 2011). При избытке активных форм кислорода защитная система может быть подавлена, и в этом случае сперматозоид будет иметь поврежденную ДНК, что оказывает влияние на фертильность (Кидун, Угольник, 2013).

Антиоксидантная система сперматозоидов состоит из трех компонентов (Кидун, Угольник, 2013):

1. ферментативный (супероксиддисмутаза, каталаза и др.);
2. неферментативный (витамины: аскорбиновая кислота, каротиноиды, токоферолы);
3. белки – хелаторы (трансферин, церулоплазмин, лактоферрин).

Патогенному воздействию АФК на организм противостоят специализированные ферментные системы. К ним можно отнести супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионредуктазу, трансферазы и др. (рис. 3). Ферментативные антиоксиданты (первичная антиоксидантная защита) превращают активные формы кислорода в перекись водорода и в менее агрессивные радикалы, а затем уже их превращают в воду и кислород (Николаев и др., 2010).

Многие продукты генов антиоксидантов важны для процесса сперматогенеза. Nrf2 регулирует экспрессию многих антиоксидантных ферментов (рис. 3), таких как: PRX, TRX, GPX, SOD, CAT и т. д. (Kensler et al., 2007; Nakamura et al., 2010).

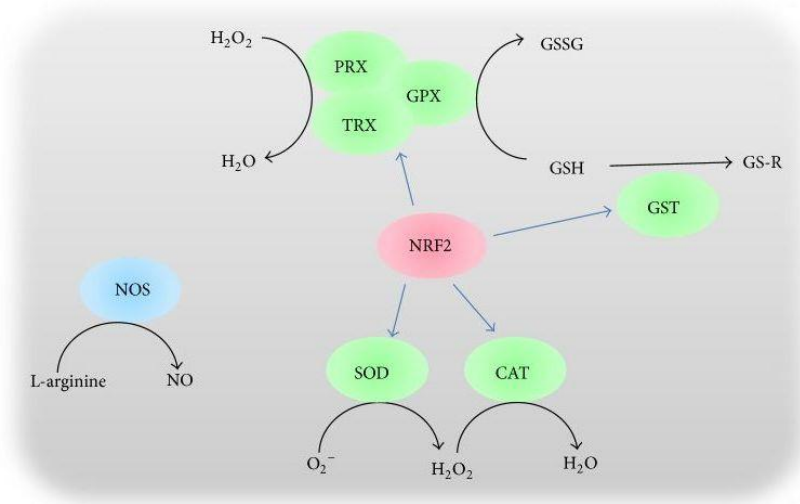


Рисунок 3- Участие Nrf2 в регуляции антиоксидантных ферментов (Bolan, Zhaofeng Huang, 2015)

К неферментативным антиоксидантам (вторичная антиоксидантная защита) можно отнести соединения, имеющие в своей структуре ароматическое кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами (витамины С, D, Е, К, F; убихиноны, триптофан, фенилаланин, флавоноиды, каротины и каротиноиды; вещества, имеющие в своем составе SH-группы) (Чанчаева и др., 2013). Механизм действия неферментативных антиоксидантов заключается в обрыве реакционных цепей: молекулы антиоксиданта взаимодействуют с активными радикалами с образованием малоактивных радикалов (Чанчаева и др., 2013).

Белки - хелаторы препятствуют использованию ионов с переменной валентностью в качестве доноров электронов, они связывают их, тем самым блокируя образование АФК. Процесс высвобождения железа из ферритина всегда включает стадию восстановления в анаэробных условиях с участием кислорода. Но при кислых значениях рН, эти реакции протекают быстрее, и высвободившееся железо может активировать перекисное окисление липидов и восстановителем железа будет аскорбиновая кислота, однако в анаэробных условиях образование железа из феррита ингибируется супероксиддисмутазой. Трансферин, лактоферин и церуплазмин способны

повышать свою концентрацию в результате нарушения гомеостаза (Магеррарамов и др., 2009).

Таким образом, можно сделать вывод, что антиоксидантная система в живых организмах представлена различными системами и веществами, которые работают в комплексе. При уменьшении активности одних антиоксидантов, соответственно увеличивается активность других, тем самым поддерживая равновесие работы про- и антиоксидантных систем.

Несколько клинических исследований были посвящены оценке взаимосвязи между уровнями антиоксидантов и повреждением ДНК спермы и сообщали о противоречивых результатах. Некоторые исследования показали, что дефицит антиоксидантов спермы связан с повреждением ДНК спермы, тогда как в других исследованиях такого отношения не наблюдалось (Zini, 2009). Имеются данные о связи нарушения АО с патоспермией. В своей работе Дашиев Б.Г. установил, что общим механизмом патогенеза патозооспермии у русских и бурят является развитие оксидативного стресса с накоплением активных продуктов перекисидации липидов на фоне снижения активности преимущественно ферментативного звена антиоксидантной системы (Дашиев, 2011).

В данном исследовании мы рассмотрим ассоциацию полиморфизма *Gln192Arg* гена *PON1* с нарушением сперматогенеза.

Параоксоназы (PON) относятся к ферментам из семейства гидролаз, которые играют важнейшую роль в защите организма от ОС (рис. 4). Фермент осуществляет гидролиз фосфорорганических соединений (нейротоксинов). Данное название – параоксоназа - белок получил из-за способности катализировать расщепление Р-О связи в молекуле фосфорсодержащего соединения параоксона, высокотоксичное действие которого в организме обусловлено его свойством необратимо (ковалентно) связывать холинэстеразу и блокировать ее функциональную активность.

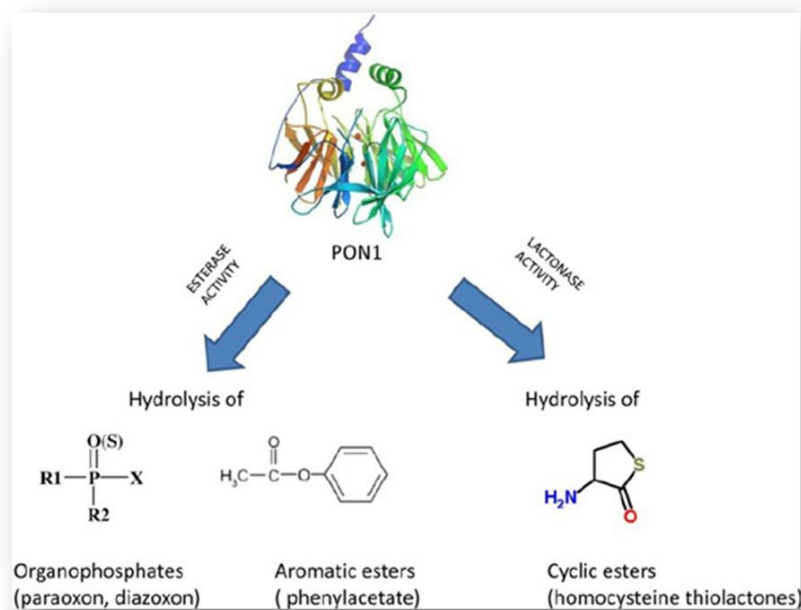


Рисунок 4 – Ферментативная активность PON1 (Lou-Bonafonte et al., 2015)

Ген *PON1* локализуется на длинном плече 7-ой хромосомы, состоит из 9-ти экзонов. Описано около 198-ти однонуклеотидных замен, но наиболее значимыми являются 2 полиморфизма. Первый полиморфизм ассоциируется с заменой в 192-ом положении глутамина на аргинин, в результате чего активность PON1 снижается. Второй полиморфизм ассоциирован с заменой аминокислоты лейцина на метионин в 55-ом кодоне, данный полиморфизм снижает уровень экспрессии гена (Колесникова Л.И. и др., 2013). По данным исследований, полиморфизм *PON1 Arg192Gln (rs662)* в китайской популяции ассоциировался с повышенным риском мужского бесплодия и высокой фрагментацией ДНК сперматозоидов (Ji, 2012).

1.5 Связь цитокинов с окислительным стрессом

В мужских половых железах цитокины вырабатываются физиологически и, как известно, участвуют в нормальном функционировании мужской половой системы. В этом отношении они

выступают в качестве естественных компонентов семенной плазмы. Основным источником цитокинов являются макрофаги яичек, однако Maegawa M. (2002) и другие авторы также наблюдали, что некоторые цитокины (IL-1 и IL-6) продуцируются клетками Лейдига и Сертоли.

Воспалительное повреждение мужских половых путей приводит к увеличению генерации активных форм кислорода (АФК). Кроме того, АФК или свободные радикалы, связанные с воспалительными реакциями могут продуцироваться бактериальными клетками, которые колонизируют репродуктивный тракт (Azenabor et al., 2015).

Исследования показали, что увеличение уровня TNF- α в сперме связано со снижением количества сперматозоидов, подвижности сперматозоидов и нарушением их морфологии (Gruschwitz et al., 1996; Sanocka, 2003). Повышенные уровни этого цитокина вызывают апоптоз клеток спермы в результате пролиферации и дифференцировки бета-клеток, пролиферации Т-клеток и естественных клеток-киллеров. Интерлейкин-1-альфа (IL-1 α) и интерлейкин-1-бета (IL-1 β) также вызывают апоптоз в сперме через пролиферацию и дифференцировку бета-клеток, хемоаттракцию лейкоцитов к месту воспаления и индукцию нейтрофилов и образование моноцитов. В другом исследовании было показано, что повышение уровня IL-1 β связано со снижением подвижности сперматозоидов (Koçak et al., 2002). Эти показатели были связаны с одновременным увеличением уровня активных форм кислорода, а также малонового диальдегида. Те же самые цитокины, которые действуют как элементы иммунной модуляции, появляются в больших концентрациях в сперме во время инфекции и при повреждении тканей. Их участие в воспалении тесно связано с сопровождающей лейкоцитоспермией (Shimoya et al., 1993; Gruschwitz et al., 1996).

В местах воспаления кровеносные сосуды, питающие яичко, расширяются, позволяя лейкоцитам выходить из центра кровеносных сосудов и взаимодействовать с эндотелием сосудов. В дополнение к этим

изменениям происходит увеличение проницаемости сосудов, что приводит к локальному накоплению жидкости – отсюда проявляется отечность и боль, а также накоплению иммуноглобулинов, комплемента и других белков спермы в половых путях. Миграция лейкоцитов из семенных пузырьков зависит от адгезивных взаимодействий, активируемых высвобождением медиаторов воспаления. Таким образом, инфекция или физическое повреждение мужских половых путей приводят в движение фагоцитирующие клетки, которые перемещаются к месту повреждения. Нейтрофилы, подвергшиеся воздействию TNF- α , активируются, происходит генерация кислородных радикалов и оксида азота, что способствует как защите хозяина, так и локальному разрушению тканей. В исследовании, разработанном для оценки клинической значимости воспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-1 β в семенной плазме бесплодных мужчин, уровни этих цитокинов значительно коррелировали с количеством лейкоцитов (Blackwell et al., 1992).

Воспалительные реакции в мужских половых путях отрицательно влияют на качество спермы и, как следствие, приводят к бесплодию. Кроме того, процесс воспаления (в котором принимают участие цитокины) генерирует АФК, усиливая, таким образом, токсическое воздействие на сперматозоиды человека (рис. 5). Дисбаланс между прооксидантными и антиоксидантными веществами в сперме приводит к метаболическим и функциональным нарушениям мужских половых клеток и может быть основной причиной бесплодия.

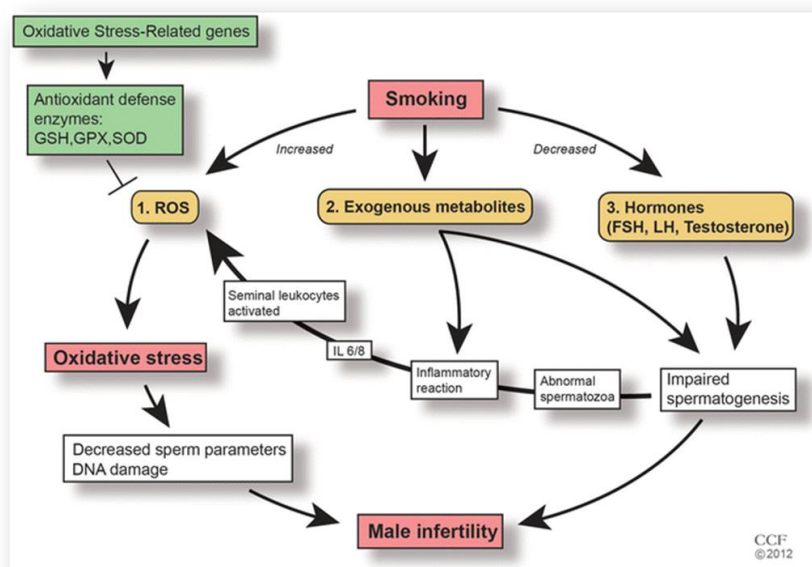


Рисунок 5 – Механизмы влияния активных форм кислорода на мужскую фертильность (Naqee et al., 2014)

Сперматогенез - это контролируемый стадийный процесс, включающий пролиферацию, мейоз и дифференцировку половых клеток. На фоне большого количества белковых регуляторов сперматогенеза, существует определённая связь цитокинов с процессом сперматогенеза, которые контролируют различные степени дифференцировки гамет в этом процессе (Демяшкин и др., 2018). Наличие провоспалительных цитокинов в мужском репродуктивном тракте (яичке, эпидидимисе и эякуляте) имеет значение для поддержания процесса сперматогенеза на физиологическом уровне. Однако при повышении концентрации уровня этих цитокинов, при процессе воспаления мужского полового тракта, они оказывают патологическое воздействие на нормальное протекание процесса образования мужских половых клеток. Кроме того, воспаление также связано с процессом окислительного стресса организма, и данный процесс, как известно, ухудшает параметры эякулята. Эпидемиологические исследования, касающиеся мужского бесплодия, показали, что все больше бесплодных мужчин страдают от острого или хронического воспаления мочевого

тракта, которое зачастую протекает без каких-либо симптомов. Воспалительные реакции в мужских половых органах неизбежно связаны с окислительным стрессом. Окислительный стресс, особенно в эякуляте, опасен, так как повреждает структуру ДНК спермы и запускает процесс апоптоза в сперме (Azenabor et al., 2015). Именно поэтому является актуальным проводить исследования в установлении ассоциации полиморфизмов генов иммунной регуляции и антиоксидантой системы организма с нарушениями репродуктивной функции мужчин.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Материалом для исследования послужили образцы эякулята 150 мужчин. В результате анализа анамнеза обследованных мужчин, а также результатов исследования эякулята мужчины были поделены на 3 группы в зависимости от показателей спермограммы – 41 мужчина с астенозооспермией, 37 человек с олигозооспермией, 24 – с астенотератозооспермией. Контрольную группу составили 48 человек с нормозооспермией. Согласно существующим нормам биоэтики все участники были проинформированы и дали согласие на использование биоматериала в научных исследованиях.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение ДНК сорбентным методом

Для выделения ДНК из эякулята использовали сорбентный метод с применением набора реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».

Принцип метода: исследуемый биологический образец обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц силики – сорбента. В результате этого происходит разрушение клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как остальные компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента посредством центрифугирования и последующей отмывки. Далее добавляется раствор для элюции ДНК, в результате чего происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который затем отделяется от частичек сорбента методом центрифугирования. В результате проведения данных манипуляций получается высокоочищенный продукт ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает в дальнейшем высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК:

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С;
2. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) необходимо прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов;
3. Подготовить в штативе необходимое количество одноразовых микропробирок и пронумеровать их;
4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами (эякулят). При этом перед процедурой экстракции нуклеиновых кислот содержимое пробирки перемешать на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки, после чего осадить капли материала со стенок пробирок и внутренней части крышек.

Процедура выделения ДНК:

1. В пустую пробирку типа «Эппендорф» внести по 300 мкл лизирующего раствора;
2. Ресуспендировать сорбент до однородности и внести в каждую пробирку по 20 мкл;
3. Добавить по 100 мкл исследуемого биоматериала (эякулят);
4. Закрывать пробирку, перемешать на «Вортексе» и поставить на 5 минут в термостат при 65 °С. Нагревание позволяет усилить действие химического лизиса физическим фактором;
5. Содержимое пробирки перемешать на «Вортексе» и поставить в планшет на 2 минуты при комнатной температуре;
6. Центрифугировать образцы в течение 30 секунд при 10 000 об/мин, далее удалить супернатант и оставить сорбент в пробирке;
7. К сорбенту добавить по 1000 мкл отмывочного раствора, далее ресуспендировать содержимое пробирки до однородного состояния;

8. Пробирку с содержимым центрифугировать в течение 30 секунд при 10000 об/мин; затем необходимо отобрать супернатант (1000 мкл);
9. Затем пробы необходимо поставить в термостат с открытыми крышками и инкубировать в течение 7 минут при температуре 65 °С (для подсушивания сорбента и полного испарения отмывочного раствора);
10. В пробирку необходимо добавить раствор для элюции ДНК – ТАЕ-буфер (70 мкл), затем ресуспендировать содержимое образцов;
11. Далее эппендорфы с закрытыми крышками необходимо поставить в термостат на 5 минут при температуре 65 °С;
12. Перемешать образцы на «Вортексе», затем центрифугировать содержимое в течение 60 секунд при 12000 об/мин;
13. В чистые пробирки перенести образовавшийся супернатант, который в дальнейшем используем в качестве исследуемого образца ДНК.

2.2.2 Анализ полиморфизма в генах методом аллель-специфичной ПЦР

Полиморфизмы $-308G>A$ гена *TNF- α* , *Gln192Arg* гена *PON1*, полиморфизма $-174G>C$ гена *IL6* исследовали с использованием набора реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия).

Принцип метода: с образцом выделенной ДНК параллельно проводят две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по нормальной аллели, гетерозигота, гомозигота по мутантной аллели.

Ход работы:

1. Подготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации в соответствии с количеством анализируемых проб;
2. Приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу: 17,5 мкл разбавителя; 2,0 мкл реакционной смеси; 0,2 мкл Taq-полимеразы. При приготовлении рабочей смеси необходимо все компоненты добавлять отдельным наконечниками с фильтрами. Такие же наконечники необходимо использовать и для внесения в пробирки образца ДНК.
3. Добавить по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки для амплификации, затем добавить во все пробирки по 1 капле минерального масла (~ 25 мкл);
4. Внести по 5 мкл образца ДНК в пробирку с рабочей амплификационной смесью по нормальной аллели и в пробирки с рабочей амплификационной смесью по полиморфной аллели. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси;
5. Перенести пробирки в предварительно прогретый амплификатор «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) для проведения реакции амплификации. Используется «горячий старт», то есть пробирки вносят в прогретый до 94 °С амплификатор. Режим амплификации 94 °С – 1 мин; далее 35 циклов: 94 °С – 10 секунд, 64 °С – 10 секунд, 72 °С – 1 минута.

2.2.3 Анализ продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле:

1. В колбу Эрленмейера необходимо добавить агарозу в количестве, необходимом для получения 3% раствора, 2000 мкл ТАЕ-буфера и 100

- мл дистиллированной воды, затем необходимо нагреть содержимое колбы в микроволновой печи до полного расплавления агарозы;
2. Охладить смесь до +/- 50 °С. Для этого использовали магнитную мешалку Biosan (Magnetic stirrer MSH 300). За время охлаждения агарозы необходимо подготовить заливочный столик для электрофореза;
 3. Для приготовления буферного раствора для электрофоретической камеры необходимо перемешать 6 мл 50xTAE-буфера и 300 мл дистиллированной воды;
 4. Для визуализации результатов электрофореза в качестве красителя добавляли 1 % раствора бромистого этидия из расчета 5 мкл на 50 мл расплавленного геля. Теплую агарозу необходимо вылить в заливочный столик для геля и равномерно ее распределить. Вертикально вставить гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1,5 мм;
 5. Необходимо оставить столик с агарозным гелем на 20 минут, затем осторожно удалить гребенки из геля. Столик с гелем помещают в камеру для проведения электрофореза;
 6. Подготовить к электрофорезу образцы исследуемой ДНК;
 7. Осторожно внести в лунки исследуемую ДНК;
 8. Провести электрофорез в течение 15 минут. Затем проанализировать гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и сфотографировать.

На рисунке 6 представлен результат электрофореза после проведения ПЦР – реакции.

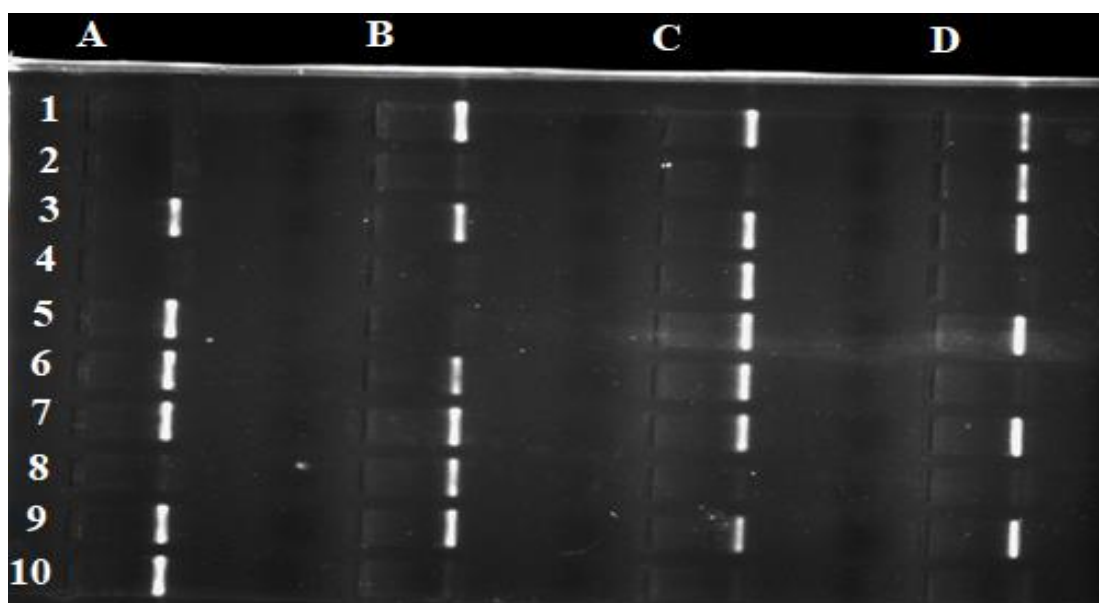


Рисунок 6 - Результат электрофоретического разделения продуктов амплификации аллельных вариантов гена *PON1*

Проанализировано 19 образцов ДНК мужчин. В каждую лунку добавлен ПЦР-продукт. Лунки 1 и 2 дорожки - это отрицательный контроль. В четных лунках - результаты ПЦР с праймерами для нормальной аллели, в нечетных лунках - результаты ПЦР с праймерами для полиморфной аллели. Гомозиготный генотип *Gln/Gln* выявлен в 12 образцах ДНК: лунки № 3, 4, 7, 8 дорожки А, лунки № 1, 2, 3, 4, 9, 10 дорожки В, лунки № 1, 2, 7, 8, 9, 10 дорожки С, лунки 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 дорожки D. У гетерозигот по полиморфизму выявляются два ПЦР-продукта - в обеих ПЦР смесях - лунки № 5, 6, 9, 10 дорожки А, лунки № 7, 8 дорожки В, лунки № 3, 4, 5, 6 дорожки С, лунки № 1, 2 дорожки D. Гомозиготный генотип *Arg/Arg* наблюдается в 1 образце - лунки 5, 6 дорожки В.

2.3.3 Методы статистического анализа

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга определяли с использованием калькулятора Equilibrium Hardy-Weinberg (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Оценку различий в распределении аллельных вариантов генов в обследованных

группах осуществляли по критерию χ^2 . О риске развития патологий сперматогенеза судили по отношению шансов (odds ratio – OR), которое вычисляли при помощи программы GraphPadInStat. OR указан с 95 %-ым доверительным интервалом (CI).

Анализ межгенных взаимодействий проводили при помощи алгоритма снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Метод MDR применяется для изучения характера межгенных взаимодействий, генетических исследований мультифакториальных полигенных заболеваний, использующих относительно небольшие объемы выборок больных и здоровых. MDR выдает найденные ассоциированные с фенотипом локусы и их комбинации, позволяет определить единичную переменную, которая имеет собирательный характер и содержит в себе информацию из нескольких локусов.

Эффекты различных комбинаций генетических маркеров трансформируются в суммарные статистики повышенного и пониженного риска по каждой n-комбинации маркеров. Затем на основании лучшей модели генерируется 10 случайных выборок, для каждой из которых рассчитывается по 2 параметра: воспроизводимость модели и точность предсказания. Среди n-моделей только модель с наиболее высокой воспроизводимостью и точностью предсказания выбирается как наилучшая. Таким образом, осуществляется переход от n-мерного пространства всех единичных полиморфных участков и фенотипа к двумерному, где одно измерение – это уровень риска, а второе – носительство данной комбинации аллелей.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму

Gln192Arg гена *PON1*

Одной из причин, способных изменить процессы сперматогенеза может быть нарушение работы антиоксидантной системы, приводящее к накоплению в организме активных форм кислорода. *PON 1* относится к генам антиоксидантной системы и кодирует фермент, который играет важную роль в защите организма от окислительного стресса (Колесникова и др., 2013). Участвуя в липидном обмене, фермент защищает липопротеины низкой плотности (ЛПНП) от окисления. Также данный фермент участвует в детоксикации органофосфатов.

Ген *PON1* локализуется на длинном плече 7-ой хромосомы, состоит из 9-ти экзонов. Описано около 198 однонуклеотидных замен в гене, но наиболее значимыми являются 2 SNP. Первый полиморфизм ассоциируется с заменой в 192-ом положении белковой молекулы глутамина на аргинин, в результате данной замены синтезируется более активная форма параоксоназы, однако она хуже защищает ЛПНП от окисления. Второй полиморфизм ассоциирован с заменой аминокислоты лейцина на метионин в 55-ом кодоне, данный полиморфизм снижает уровень экспрессии гена (Колесникова и др., 2013).

В таблице 1 приведены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* в контрольной группе и группе с астенозооспермией. Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* в группе мужчин с астенозооспермией и контрольной группе соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 1).

Из данных таблицы 1 видно, что в обеих группах мужчин преобладает аллель *Gln192*. Частота генотипа *Gln/Gln* в контрольной группе составила 56,3 %, в группе с астенозооспермией - 63,4 %, на долю гетерозигот в контрольной группе и в группе с патоспермией приходится 35,4 % и 28,6 %

соответственно. Мы можем также наблюдать незначительное увеличение доли лиц с генотипом *Arg/Arg* в группе с астенозооспермией (9,8 %) по сравнению с контрольной группой (8,3 %). Однако данные различия между двумя группами в частотах генотипов статически не значимы ($p=0,68$).

Таблица 1 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* среди мужчин с астенозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Астенозооспермия	Контроль	χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>	
	n = 41	n =48			Знач.	95% CI
<i>Gln192</i>	0.768	0.740	0.20	0.66	1.17	0.59 – 2.32
<i>192Arg</i>	0.232	0.260			0.86	0.43 – 1.70
<i>Gln/Gln</i>	0.634	0.563	0.76	0.68	1.35	0.57 – 3.17
<i>Gln/Arg</i>	0.268	0.354			0.67	0.27 – 1.66
<i>Arg/Arg</i>	0.098	0.083			1.19	0.28 – 5.09
<i>PXB</i> (χ^2)	2,49	0,31				

Рассмотрим распределение частот аллелей и генотипов в группе мужчин с олигозооспермией и контрольной группе по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1*. Данные приведены в таблице 2. В группе мужчин с олигозооспермией выявлено повышение доли гетерозигот (54,1 %) при одновременном снижении частоты регистрации гомозигот по аллели *Gln192*. Однако, разница в распределении частот генотипов между двумя группами мужчин статистически незначима ($p=0,21$). Таким образом, в проведенном исследовании не было выявлено наличия ассоциации полиморфизма *Gln192Arg* гена *PON1* с нарушениями сперматогенеза, в частности, с олигозооспермией.

Таблица 2 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Олигозооспермия	Контроль	χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>	
	n = 37	n =48			Знач.	95% CI
<i>Gln192</i>	0.649	0.740	1.65	0.2	0.65	0.34 – 1.26
<i>192Arg</i>	0.351	0.260			1.54	0.80 – 2.98
<i>Gln/Gln</i>	0.378	0.563	3.14	0.21	0.47	0.20 – 1.14
<i>Gln/Arg</i>	0.541	0.354			2.15	0.89 – 5.15
<i>Arg/Arg</i>	0.081	0.083			0.97	0.20 – 4.63
<i>PXB</i> (χ^2)	1.27	0,31				

В таблице 3 представлено распределение частот аллелей и генотипов по исследуемому полиморфизму гена *PON1* среди мужчин с астенотератозооспермией и контрольной группы. Данные распределения частот и генотипов соответствуют равновесию Харди-Вайнберга (таблица 3).

Таблица 3 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* среди мужчин с астенотератозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Астенотератозооспермия	Контроль	χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i>	
	n = 24	n =48			Знач.	95% CI
<i>Gln192</i>	0.771	0.740	0.17	0.68	1.18	0.53 – 2.67
<i>192Arg</i>	0.229	0.260			0.84	0.37 – 1.90
<i>Gln/Gln</i>	0.542	0.563	2.46	0.29	0.92	0.34 – 2.46
<i>Gln/Arg</i>	0.458	0.354			1.54	0.57 – 4.18
<i>Arg/Arg</i>	0.000	0.083			0.20	0.01 – 3.91
<i>PXB</i> (χ^2)	2,1	0,31				

Как видно из данных таблицы 3 в группе с астенотератозооспермией и контрольной группе преобладает аллель *Gln192*, на ее долю приходится 77,1% и 74 %, соответственно. Для группы мужчин с патоспермией наблюдается увеличение частоты генотипа *Gln/Arg* – 45,8 %, тогда как в контрольной группе на долю гетерозигот приходится 35,4 %. Частота встречаемости генотипа *Arg/Arg* в контрольной группе составляет 8,3 %, в то время, как в группе мужчин с астенотератозооспермией данный вариант генотипа вообще отсутствует. Распределение частот аллелей и генотипов в двух сравниваемых группах мужчин статистически не отличается ($p=0,68$ и $p=0,29$, соответственно). Таким образом, в ходе исследования мы не обнаружили статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* между двумя группами мужчин.

Полученные нами данные соответствуют данным литературы. Так иранскими учеными (Tavilani и др., 2014) было проведено исследование, направленное на изучение распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизму *Gln192Arg* гена *PON1* среди бесплодных (150 человек) и фертильных мужчин (150 человек). Результаты их работы показали, что распределение генотипов и аллелей по исследуемому полиморфизму гена *PON1* статистически не отличалось между группами фертильных и бесплодных мужчин. В то же время есть данные литературы, указывающие на возможный вклад аллельных вариантов гена параоксоназы в формирование свойств мужских половых клеток. По данным исследования Lazaros с коллегами (2011) было обнаружено, что мужчины с аллелем *PON1 Gln192* имеют более высокую подвижность сперматозоидов, чем носители аллеля *192Arg*.

3.2 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму *-174G>C* гена *IL6*

По данным современных исследований известно, что загрязняющие химические агенты окружающей среды, неправильное питание, стресс, употребление алкоголя, курение отрицательно влияют на оплодотворяющий потенциал сперматозоидов. Помимо этого, увеличение количества бесплодных мужчин может быть связано с широким распространением воспалительных заболеваний урогенитального тракта, что определяет важность исследования иммунологических факторов, к которым относятся, в том числе и цитокины (Максимюк и др., 2015). Известно, что интерлейкины синтезируются иммунными клетками семенников, интерстициальными клетками, клетками Сертоли и сперматогониями тканей органов половой системы мужчин и самцов животных (Максимюк и др., 2015). При снижении интенсивности их синтеза происходят изменения функциональной деятельности органов половой системы, что способствует развитию бесплодия у мужчин (LiQian и др., 2012). Интерлейкины также участвуют в стимуляции внутриклеточных сигналов, участвуют в регуляции роста и дифференциации зачаточных клеток, регулируют репродуктивную, нейроэндокринную и тестикулярную функции тканей половых органов (Максимюк А.В. и др., 2015).

IL-6 относится к базовым медиаторам острой фазы воспалительной реакции. Данный цитокин можно обнаружить в различных биологических жидкостях, в частности в сперме. Источником его в эякуляте являются клетки Сертоли (Максимюк и др., 2015). Известно, что повышение концентрации интерлейкинов (IL-6, IL-8) в спермальной плазме связано с развитием воспалительных процессов в органах половой системы мужчин (Eggert-Kruse др., 2001; Nandipati и др., 2005).

Ген *IL6* расположен на 7-й хромосоме в локусе 7p21-p14. Как в кодирующей последовательности, так и в промоторной области данного гена

были обнаружены многочисленные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Одним из наиболее часто встречающихся и проанализированных полиморфизмов является замена G (гуанин) на C (цитозин) в положении -174 промотора (Рорко и др., 2010).

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма *-174G>C* гена *IL6* соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 4). Из данных, представленных в таблице 3, видно, что распределение частот аллелей в контрольной группе и группе с олигозооспермией практически не отличаются, в контрольной группе на долю нормальной аллели приходится 45,8 %, тогда как в группе с олигозооспермией – 47,3 %. При анализе частот генотипов выявлено увеличение доли гетерозигот в группе мужчин с олигозооспермией – 51,4 %, тогда как в контрольной группе данный показатель составил 37,5 %. В то же время установлено снижение частоты гомозигот по полиморфному варианту гена в группе мужчин с олигозооспермией (27 %) по сравнению с контрольной группой (35,4 %). Данные различия в распределении частот аллелей и генотипов статистически не значимы ($p=0,85$ и $p=0,44$ соответственно).

Таблица 4 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *-174G>C* гена *IL6* среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Олигозооспермия %	Контроль %	χ^2	P	OR	
	n = 37	n = 48			Знач.	95% CI
G	0,473	0,458	0,036	0,85	1,062	0.61 - 1.85
C	0,527	0,542			0,94	0.54 - 1.64
G/C	0,216	0,271	1,64	0,44	0,74	0.27- 2.04
G/C	0,514	0,375			1,76	0.74 - 4.20
C/C	0,270	0,354			0,68	0.26 - 1.72
PXB (χ^2)	0,03	2,88				

Результаты генотипирования по полиморфизму $-174G>C$ гена *IL6* для мужчин с астенозооспермией и контрольной группы представлены в таблице 5. Для исследуемых групп распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 5 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму $-174G>C$ гена *IL6* среди мужчин с астенозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Астенозооспермия %	Контроль %	χ^2	<i>p</i>	OR	
	n = 41	n = 48			Знач.	95% CI
<i>G</i>	0,463	0,458	0,005	0,95	1,02	0.59-1.78
<i>C</i>	0,537	0,542			0,98	0.56 -1.71
<i>G/G</i>	0,171	0,271	3,95	0,14	0,55	0.20- 1.56
<i>G/C</i>	0,585	0,375			2,35	1.00-5.52
<i>C/C</i>	0,244	0,354			0,58	0.23- 1.48
<i>PXB</i> (χ^2)	1,29	2,88				

По данным из таблицы 5 видно, что в обеих группах преобладает аллель *G*. В контрольной группе частота данной аллели составила 45,8 %, группе с астенозооспермией – 46,3 %. В группе мужчин с астенозооспермией наблюдается снижение частоты генотипа *G/G* (17,1 % по сравнению с 27 % в контрольной группе), а так же увеличение частоты регистрации гетерозигот (58,5 % по сравнению с 37,5 % в контроле). В то же время установлено, что частота генотипа *C/C* в контрольной группе выше, чем в группе с патоспермией (35,4 % и 24,4 %, соответственно). Статистически значимых различий в распределении частот аллелей ($p=0,95$) и генотипов ($p=0,14$) не было выявлено.

По данным таблицы 6 мы можем заключить, что распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму $-174G>C$ гена *IL6* в контрольной группе и группе мужчин с астенозооспермией соответствует

равновесию Харди-Вайнберга. Частота аллели *-174G* среди мужчин с астенотератозооспермией составила 52 %. Распределение частот аллелей и генотипов по исследуемому полиморфизму в группе с астенотератозооспермией по отношению к контрольной группе статистически не различается ($p=0,48$ и $p=0,82$).

Таблица 6 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *-174G>C* гена *IL6* среди мужчин с астенотератозооспермией и контрольной группы

Генотип, аллель	Астено- тератозооспермия%	Контроль %	χ^2	p	OR	
	n = 24	n =48			Знач.	95% CI
<i>G</i>	0,520	0,458	0,51	0,48	1,27	0.73 - 2.22
<i>C</i>	0,480	0,542			0,79	0.45 - 1.37
<i>G/G</i>	0,333	0,271	0,4	0,82	1,35	0.47 - 3.89
<i>G/C</i>	0,375	0,375			1,00	0.36 - 2.75
<i>C/C</i>	0,292	0,354			0,75	0.26 - 2.17
<i>PXB</i> (χ^2)	1,48	2,88				

Несмотря на то, что в проведенном нами исследовании не было установлено ассоциации исследуемого полиморфизма гена интерлейкина 6 с нарушениями сперматогенеза, есть данные литературы об ассоциации данного полиморфизма с нарушением мужской фертильности. По результатам исследований индийских ученых было обнаружено, что исследуемый полиморфизм гена *IL6* ассоциируется с нарушением фертильности у мужчин, а именно в данном исследовании была обнаружена ассоциация полиморфизма *-174G>C* гена *IL6* с олигозооспермией (Shukla et al., 2013).

3.3 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму -308G>A гена *TNF-α*

TNFα является плейотропным цитокином, который вовлечен во многие процессы. Этот цитокин обеспечивает быструю защиту клетки-хозяина от инфекции, но при повышенном синтезе он может оказывать негативное воздействие. TNFα также влияет на метаболизм липидов, коагуляцию, резистентность к инсулину, а также на гипоталамо-гипофизарную систему. На экспериментальных моделях показано, что цитокины и, в частности, TNFα взаимодействуют с эндокринной системой, участвуя в контроле функций яичек. Некоторые цитокины оказывают прямое влияние на функции яичек; некоторые из них, такие как TNFα, продуцируются в яичке даже в отсутствие случаев воспаления или иммунной активации (Tronchon и др., 2008).

Ген *TNF-α* кодирует провоспалительный цитокин который участвует в процессе клеточной пролиферации, дифференцировке, апоптозе, обмене липидов, свертываемости, резистентности к инсулину, и эндотелиальной функции. Исследуемый нами полиморфизм -308G>A влияет на уровень транскрипции гена фактора некроза опухоли и, следовательно, на концентрацию кодируемого белка.

В таблице 7 представлено распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму -308G>A гена *TNF-α* среди мужчин с олигозооспермией. Установлено, что равновесие Харди-Вайнберга соблюдается.

Частота аллели G в контрольной группе составляет 77 %, тогда как в группе мужчин с олигозооспермией – 89,2 % (табл. 7). Частота полиморфного варианта гена (A) в контрольной группе (23%) выше, чем в группе с олигозооспермией (10,8 %). Выявлены статистически значимые различия в частоте аллелей по полиморфизму -308G>A гена *TNF-α* ($p=0,04$). Таким образом, для аллели -308G выявлена ассоциация с повышенным

относительным риском развития олигозооспермии (OR=2,41;CI 1.10 - 5.27), тогда как аллель -308A ассоциирована с протективным эффектом.

Таблица 7 - Распределение частот аллелей генотипов по полиморфизму - 308G>A гена TNF-α среди мужчин с олигозооспермией

Генотип, аллель	Олигозооспермия %	Контроль %	χ^2	P	OR	
	n = 37	n =48			Знач.	95% CI
G	0,892	0,770	4,2	0,04	2,416	1.10 - 5.27
A	0,108	0,230			0,42	0.19 - 0.90
G/G	0,783	0,562	4,87	0,09	2.819	1.07 -7,43
G/A	0,217	0,416			0.386	0,15-1.02
A/A	0,0	0,022			0,42	0.02 - 10.66
PXB (χ^2)	0,54	1,54				

Частота генотипа G/G значительно ниже в контрольной группе по сравнению с группой с патоспермией – 56,2 % в контрольной группе и 78,3 % в группе с олигозооспермией. Число гетерозигот GA выше в контрольной группе. Также стоит отметить, что генотип A/Av группе мужчин с олигозооспермией не выявлен.

В таблице 8 представлены результаты изучения распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму -308G>A гена TNF-α среди мужчин с астенозооспермией. Установлено, что различия в частотах аллелей по полиморфизму -308G>A гена TNF-α между двумя данными группами мужчин статистически не значимы (p=0,82). Частота генотипа GG в контрольной группе составляет 56,2 %, в группе с астенозооспермией – 59 %. Стоит отметить незначительное увеличение частоты генотипа A/A в группе мужчин с астенозооспермией (7%, тогда как в контрольной группе 2,2 %).

Однако различия в частотах генотипов полиморфизму $-308G>A$ гена $TNF-\alpha$ между двумя группами мужчин статистически не значимы ($p=0,43$).

Таблица 8 - Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму $-308G>A$ гена $TNF-\alpha$ среди мужчин с астенозооспермией

Генотип, аллель	Астено- зооспермия%	Контроль %	χ^2	P	OR	
	n = 41	n =48			Знач.	95% CI
G	0,760	0,770	0,05	0,82	0,95	0.49 - 1.82
A	0,240	0,230			1,05	0.55 - 2.03
G/G	0,590	0,562	1,7	0,43	1,09	0.47 - 2.55
G/A	0,340	0,416			0,73	0.31- 1.72
A/A	0,07	0,022			3,71	0.37 - 37.13
PXB (χ^2)	0,26	1,54				

В таблице 9 представлены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена $TNF-\alpha$ в контрольной группе и группе мужчин с астенозооспермией. Выявлена тенденция к статистически значимым различиям в распределении частот аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена $TNF-\alpha$ ($p=0,07$). Частота аллели $-308G$ гена $TNF-\alpha$ среди лиц с астенозооспермией наибольшая среди всех обследованных групп мужчин. В группе мужчин с астенозооспермией частота генотипа G/G составляет 79,2 %, а гетерозиготы составили 20,8 %, тогда как в контрольной группе 56,2 % и 41,6 %, соответственно. Однако данные различия в частотах генотипов статистически не значимы ($p=0,15$).

Таким образом, в проведенном нами исследовании для аллели $-308G$ выявлена ассоциация с повышенным относительным риском развития

олигозооспермии (OR=2,41; CI 1.10 - 5.27), а также была обнаружена тенденция к статистически значимым различиям в распределении частот аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF- α* в группе мужчин с астенотератозооспермией ($p=0,07$). Данный полиморфизм $-308G>A$ характеризуется повышенной экспрессией *TNF- α* , в результате чего усиливаются процессы апоптоза, клеточной пролиферации, дифференцировки, обмена липидов, свертываемости и др. Можно предположить, что у носителей аллели $-308G$ формируется базовый уровень фактора некроза опухоли, который не всегда оказывается достаточным для нормального протекания процессов сперматогенеза.

Таблица 9 - Распределение частот аллелей генотипов по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF- α* среди мужчин с астенотератозооспермией

Генотип, аллель	Астено- тератозооспермия %	Контроль %	χ^2	p	OR	
	n = 24	n = 48			Знач.	95% CI
<i>G</i>	0,896	0,770	3,28	0,07	1,19	0.61 - 2.35
<i>A</i>	0,104	0,230			0,84	0.43 - 1.65
<i>G/G</i>	0,792	0,562	3,82	0,15	2,95	0.95 - 9.23
<i>G/A</i>	0,208	0,416			0,37	0.12- 1.15
<i>A/A</i>	0,0	0,022			0,64	0.03- 16.46
<i>PXB</i> (χ^2)	0,32	1,54				

По данным литературы в азиатских популяциях выявляется ассоциация аллели $-308A$ гена *TNF- α* с патологиями сперматогенеза. Shukla K.K. с соавторами в своих исследованиях показали связь исследуемого полиморфизма с мужской фертильностью и функцией сперматозоидов. В исследовании принимали участие три группы мужчин – контрольная, группа с астенозооспермией и олигозооспермией, по 260 человек в каждой группе.

Было установлено, что замена *G* на *A* в промоторном участке гена *TNF-α* значительно чаще выявляется у бесплодных субъектов по сравнению с контрольной группой. Уровень апоптоза и некроза также был выше в группах с олигозооспермией и астенозооспермией. Кроме того, было обнаружено, что это связано с повышенным уровнем активных форм кислорода в клетках семенников мужчин из групп с олигозооспермией и астенозооспермией. Таким образом, для индийской популяции данное исследование показало ассоциацию между полиморфизмом $-308G>A$ гена *TNF-α* и нарушением фертильности (Shukla et al, 2013).

Также по данным литературы установлено, что повышенная частота аллеля $-308A$ была обнаружена у пациентов с низким количеством сперматозоидов ($P = 0,002$; $OR = 2,93$), или с нормальным количеством, но измененной подвижностью сперматозоидов ($P=0,003$; $OR=2,32$) по сравнению с группой пациентов с нормальным количеством сперматозоидов и качеством (морфология и подвижность) (Tronchon et al, 2008).

3.4 Анализ межгенного взаимодействия генов иммунной регуляции и антиоксидантов при нарушениях сперматогенеза

Патологии, которые связаны с нарушением мужской репродуктивной системы, являются сложными мультифакторными состояниями, именно поэтому актуально изучить не только отдельные распределения аллелей генов, но и их сочетание. В данной работе исследование отдельных полиморфизмов генов *PON1*, *IL6* не дало статистически значимых различий между контрольной группой и группами с нарушениями сперматогенеза.

Для анализа сочетанного вклада аллельных вариантов исследуемых генов был проведен анализ межгенных взаимодействий с помощью алгоритма снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction – MDR). Модель межгенных взаимодействий считали валидной, если согласованность (Cross Validation Consistency) была не меньше 9/10.

Полученные модели характеризуются коэффициентом перекрестной проверки CV (cross-validation) и степенью взаимодействия генов.

В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *TNF-α*, *IL6*, *PON1* при сравнении двух групп мужчин – контрольной и мужчин с астенотератозооспермией была установлена статически значимая модель (таблица 10).

Таблица 10 - Модель взаимодействия исследуемых генетических локусов у мужчин с астенотератозооспермией

Комбинации генов в модели	Тестируемое взаимодействие генов	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR (95% CI)
<i>TNF-α</i> (-308G>A), <i>IL6</i> (-174G>C) <i>PON1</i> (Gln192Arg)	0,54	10/10	12,3 (p = 0,0004)	7,63 (2,25 - 25,8)

По данным таблицы 10 мы можем наблюдать, что у трехлокусной модели взаимодействия «*TNF-α* (-308G>A), *PON1* (Gln192Arg), *IL6* (-174G>C)» максимальная воспроизводимость – 10/10, таким образом, она является значимой моделью межгенного взаимодействия.

На рисунке 7 показано распределение частот генотипов при трехлокусном взаимодействии генов *TNF-α* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (Gln192Arg) среди мужчин с астенотератозооспермией и контрольной группы.

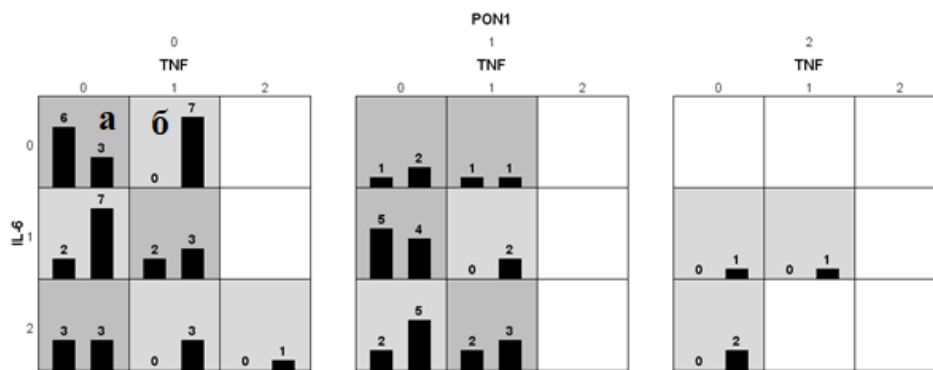


Рисунок 7 - Распределение частот трехлокусных сочетаний генотипов генов *TNF- α* ($-308G>A$), *IL6* ($-174G>C$), *PON1* (*Gln192Arg*) среди мужчин контрольной группы и с астенотератозооспермией. (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – мужчины с астенотератозооспермией, правые столбики в ячейках – контрольная группа; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2; а – пример генотипа повышенного риска, б – пример генотипа пониженного риска)

Согласно данной модели выявлен генотип повышенного риска (рис 7, а): гомозиготы по аллели $-308G$ гена *TNF- α* , гомозиготы по аллели $-174G$ гена *IL6*, гомозиготы по аллели *Gln192* гена *PON1*. Относительный риск (OR) развития астенотератозооспермии у мужчин с данным генотипом составляет 5,0 (1,13 – 22,19) ($p=0,059$, $\chi^2=3,57$).

Потенциальный генотип пониженного риска (рис 7, б) развития астенотератозооспермии характерен для мужчин, являющихся гетерозиготами $-308G/A$ гена *TNF- α* , гомозиготами по аллели $-174G$ *IL6*, гомозиготами по аллели *Gln192* гена *PON1*, однако разница в распределении частот генотипов между двумя сравниваемыми группами мужчин статистически не значима ($p=0,12$).

Анализ ген-генных взаимодействий (рис. 8) показывает, что наиболее высокая индивидуальная информационная ценность характерна для гена

TNF- α (4,27 %), а также для гена *PON1* (3,7 %). Однако при взаимодействии полиморфных вариантов генов *IL6* и *PON1*, а также *TNF- α* и *PON1* наблюдается отсутствие синергизма, то есть при взаимодействии данные локусы ослабляют эффект друг друга, что характеризуется снижением патогенного эффекта в развитии данной патологии, в частности астенотератоооспермии.

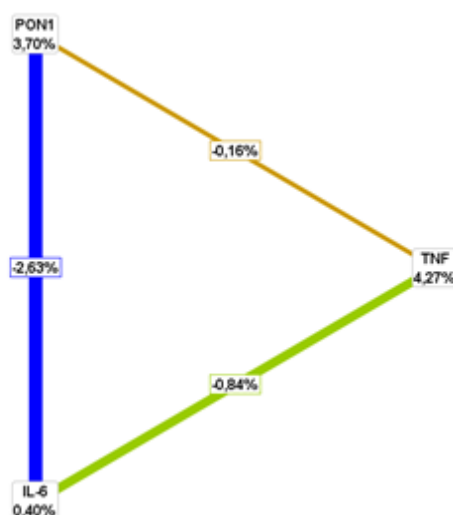


Рисунок 8 - Графическое представление результатов анализа взаимодействия между полиморфными вариантами генов *TNF- α* , *IL6*, *PON1* в контрольной группе и группе мужчин с астенотератозооспермией. На вершинах треугольника представлена информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров, зеленым и синим цветом обозначено отсутствие синергизма

В результате межгенного анализа полиморфных вариантов генов *TNF- α* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (Gln192Arg) при сравнении контрольной группы и группы мужчин с астенозооспермией была выявлена статистически значимая модель (таблица 11).

Таблица 11 - Модель взаимодействия исследуемых генетических локусов у мужчин с астенозооспермией

Комбинации генов в модели	Тестируемое взаимодействие генов	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR (95% CI)
<i>TNF-a</i> (-308G>A), <i>IL6</i> (-174G>C) <i>PON1</i> (Gln192Arg)	0,55	10/10	10,3 (p = 0,0013)	4,7 (1,8 - 12,3)

На рисунке 9 показано распределение частот генотипов при трехлокусном взаимодействии генов *TNF-a* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (Gln192Arg) среди мужчин с астенозооспермией и контрольной группы.

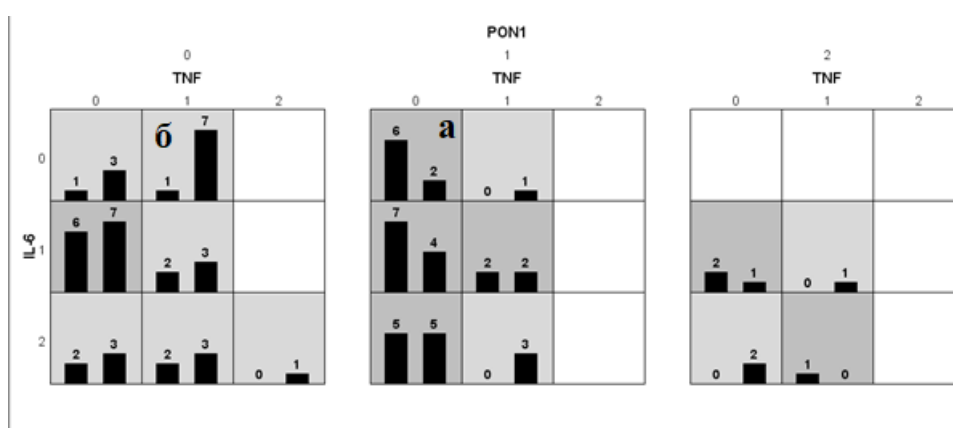


Рисунок 9 - Распределение частот трехлокусных сочетаний генотипов генов *TNF-a* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (Gln192Arg) среди мужчин контрольной группы и с астенозооспермией (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – мужчины с астенозооспермией, правые столбики в ячейках – контрольная группа; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2; а – пример генотипа повышенного риска, б – пример генотипа пониженного риска)

Согласно данной модели выявлен потенциальный генотип повышенного риска (рис 9, а): гомозиготы по аллели -308G гена *TNF-a*, гомозиготы по аллели -174G гена *IL6*, гетерозиготы *Gln192Arg* гена *PON1*.

Однако, разница в частоте регистрации данного генотипа в сравниваемых группах мужчин статистически незначима ($p=0,18$). Генотип, потенциально снижающий риск развития астенозооспермии (рис 9, б) характерен для мужчин, являющихся гомозиготами по аллели $-308G$ гена *TNF- α* , гомозиготами по аллели $-174G$ гена *IL6*, гомозиготами по аллели *Gln192* гена *PON1*, разница в распределении частот генотипов статистически не значима ($p=0,1$).

Результаты анализа ген-генных взаимодействий для контрольной группы и группы с астенозооспермией (рис. 10) позволили выявить отсутствие синергизма между полиморфизмами генов *TNF- α* ($-308G>A$) и *PON1* (*Gln192Arg*), а также для гена *TNF- α* ($-308G>A$) и *IL6* ($-174G>C$) (рис. 10). Максимальная информационная ценность наблюдается для гена *TNF- α* , его вклад в развитие астенозооспермии составляет 4,53 %. Общая информационная ценность для трех генов составила 8,6 %.

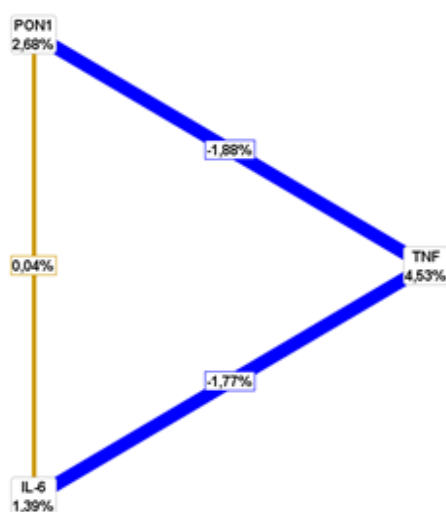


Рисунок 10 - Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *TNF- α* , *IL6*, *PON1* в контрольной группе и группе мужчин с астенозооспермией. На вершинах треугольника представлена информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров

В результате межгенного анализа полиморфных вариантов генов при сравнении контрольной группы и группы мужчин с олигозооспермией была выявлена статистически значимая модель (таблица 12).

По данным таблицы 12 мы можем наблюдать, что у трехлокусной модели взаимодействия «*TNF-α* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (*Gln192Arg*)» максимальная воспроизводимость – 10/10, таким образом, она является значимой моделью межгенного взаимодействия.

Таблица 12- Модель взаимодействия исследуемых генетических локусов у мужчин с олигозооспермией

Комбинации генов в модели	Тестируемое взаимодействие генов	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR (95% CI)
<i>TNF-α</i> (-308G>A), <i>IL6</i> (-174G>C) <i>PON1</i> (<i>Gln192Arg</i>)	0,61	10/10	19,08 (p < 0,0001)	7,53 (2,92 - 19,4)

На рисунке 11 показано распределение частот генотипов при трехлокусном взаимодействии генов *TNF-α* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (*Gln192Arg*) среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группы.

По результатам анализа данной модели выявлен генотип повышенного риска развития олигозооспермии (рис 11, а): гомозиготы по аллели -308G гена *TNF-α*, гетерозиготы -174GC гена *IL6*, гомозиготы по аллели *Gln192* гена *PON1*. Однако необходимы дальнейшие исследования, так как в данном случае наблюдается тенденция к статистически значимым различиям в частоте регистрации данного генотипа в двух исследуемых группах мужчин (p=0,077, $\chi^2=3,12$). Относительный риск развития олигозооспермии у мужчин с данным генотипом составляет 4,14 (1,01– 6,18).

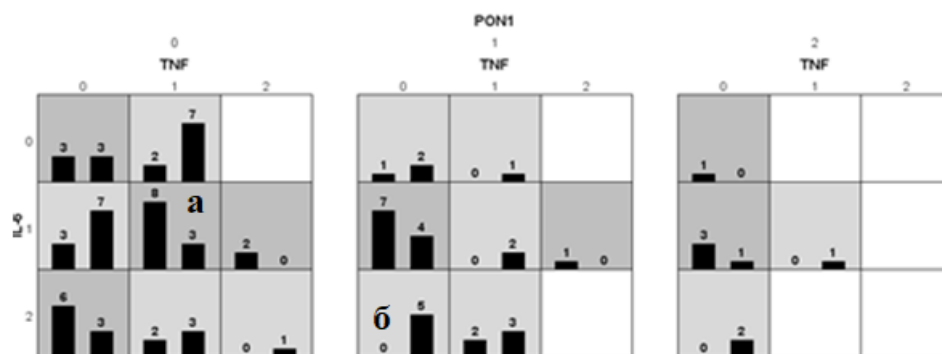


Рисунок 11 - Распределение частот трехлокусных сочетаний генотипов генов *TNF-α* (-308G>A), *IL6* (-174G>C), *PON1* (*Gln192Arg*) среди мужчин контрольной группы и с олигозооспермией (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – мужчины с олигозооспермией, правые столбики в ячейках – контрольная группа; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2; а – пример генотипа повышенного риска, б – пример генотипа пониженного риска)

Генотип пониженного риска развития олигозооспермии (рис 9, б) развития характерен для мужчин, являющихся гомозиготами по аллели -308G гена *TNF-α*, гомозиготами по аллели -174C гена *IL6*, гетерозиготами *Gln192Arg* гена *PON1*. Однако различия в частоте регистрации данного генотипа в двух группах мужчин статистически не значимы ($p=0,11$).

Результаты анализа ген-генных взаимодействий для контрольной группы и группы мужчин с олигозооспермией (рис. 12) позволили нам выявить наличие синергизма для исследуемых полиморфных локусов генов *IL6* (-174G>C) и *PON1* (*Gln192Arg*), их общий вклад в развитие олигозооспермии составляет 6,59 %. Полиморфные варианты данных генов усиливают эффект друг друга, таким образом они увеличивают риск развития данной патологии.

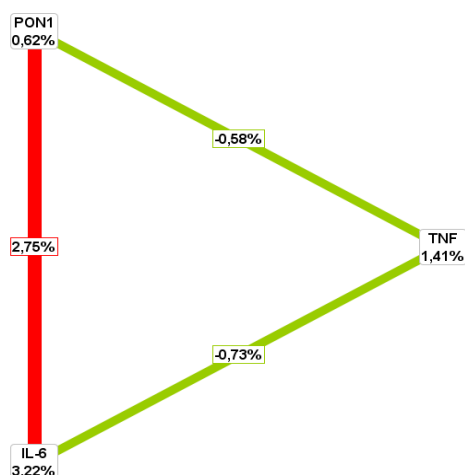


Рисунок 12 - Графическое представление результатов анализа взаимодействия между генами *TNF- α* , *IL6*, *PON1* в контрольной группе и группе мужчин с олигозооспермией.

На вершинах треугольника представлена информационная ценность каждого маркера в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары маркеров, зеленым цветом обозначено отсутствие синергизма, красным – наличие синергизма

ВЫВОДЫ

1. Однонуклеотидный полиморфизм *Gln192Arg* гена *PON1* не ассоциирован с нарушениями сперматогенеза.
2. Однонуклеотидный полиморфизм *-174G>C* гена *IL6* не ассоциирован с нарушениями сперматогенеза.
3. Выявлены статистически значимые различия в частотах аллелей по полиморфизму *-308G>A* гена *TNF-α* среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группой. Для аллели *-308G* выявлена ассоциация с повышенным относительным риском развития олигозооспермии ($p=0,04$; $OR=2,41$; $CI\ 1.10 - 5.27$).
4. Выявлена тенденция к статистически значимым различиям в распределении частот аллелей по полиморфизму *-308G>A* гена *TNF-α* для мужчин с астенотератозооспермией по сравнению с контрольной группой ($p=0,07$).
5. При анализе межгенного взаимодействия исследуемых локусов выявлен генотип высокого риска развития астенотератозооспермии ($OR=5,0$ ($1,13 - 22,19$; $p=0,059$, $\chi^2=3,57$)): *-308GG TNF-α / -174GG IL6 / Gln192Gln PON1*.
6. Повышенный риск развития олигозооспермии возможен для генотипа *-308GG TNF-α / -174GC IL6 / Gln192Gln PON1* ($p=0,077$, $\chi^2=3,12$; $OR=4,14$ $CI\ 1,01 - 6,18$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Айзикович Б. И. и др. Взаимосвязь морфологических нарушений сперматозоидов с уровнем цитокинов семенной плазмы у мужчин, состоящих длительное время в бесплодном браке // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, №. 2-3. – С. 203-208.
2. Айзикович Б. И., Антонов А. Р., Устинов Д. В. Взаимосвязь цитокинового и микроэлементного профиля с качеством семенной плазмы // Новосибирский государственный университет. – Новосибирский государственный университет. – 2010 – Т. 8, №4 – С. 76-82.
3. Божедомов В. А. и др. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы) // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – Т. 3. – С. 10-6.
4. Гагулин И. В. и др. Полиморфизм G308A гена фактора некроза опухоли А и депрессия в открытой популяции мужчин 25-64 г. Новосибирска (Эпидемиологическое исследование по программе ВОЗ Monica-psychosocial) // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2018. – Т. 10, №. 1 – С. 43 – 46.
5. Галимов Ш. Н., Галимова Э. Ф., Павлов В. Н. Цитокиновый спектр сыворотки крови и спермоплазмы при идиопатическом бесплодии // Пермский медицинский журнал. – 2012. – Т. 29, №. 6 – С. 58- 63.
6. Дашиев Б.Г. Некоторые закономерности и механизмы нарушений репродуктивной функции у мужчин различных этнических групп в Республике Бурятия: автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2011. - 26 с.
7. Демяшкин Г. А. и др. Влияние интерлейкинов IL-1A, IL-1 β И IL-1RA на развитие мужских гамет в норме и при гипосперматозе // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13, №. 2 – С. 379 – 382.
8. Долгушина Н. В., Глинкина Ж. И. Оптимизация исходов

программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с повышенным уровнем анеуплоидии в сперматозоидах: дисс... канд мед наук. – Москва, 2015. – 146 с.

9. Кадагидзе З. Г. онкологический научный центр им. НН Блохина РАМН, Москва // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, №. 3-2003. – С. 131.

10. Калинин С. Ю., Тюзиков И. А. Окислительный стресс и мужское бесплодие взаимосвязанные пандемии XXI в. Современные фармакотерапевтические возможности патогенетической коррекции нарушений сперматогенеза препаратами L-карнитина/ацетил-L-карнитина // Эффективная фармакотерапия. – 2017. – №. 22. – С. 6-19.

11. Кидун К. А., Угольник Т. С. Митохондриальная дисфункция сперматозоидов в патогенезе патоспермий при окислительном стрессе (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии/ - 2013 - Выпуск № 2 (36) — С. 20 – 24.

12. Колесникова Л.И., Баранова Т.А., Первушина О.А. Гены ферментов антиоксидантной системы // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – №12. – С. 83-88.

13. Колпаков И.Е., Афанасьев Д.Е. Системный воспалительный ответ (обзор) // Новые медицинские технологии. — 2003. — № 5-6. — С. 70-75.

14. Коненков В. И. и др. Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2 типа // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, №. 4 – С. 173 – 183.

15. Ломтева С.В. Окислительный стресс и мужская репродуктивная система / Ломтева С.В., Савикина К.Г., Шестель А.Н., Сагамонова К.Ю., Шкурат Т.П. // Валеология. — 2015. — № 1. — С. 59-65.

16. Магеррамов А.М., Алиев И.А., Аскерова У.Ф, Сулейманова Л.М. Магеррамов М.Н. Активные формы кислорода в живых системах. – 2009 - №4 – С. 48.

17. Максимюк А.В., Воробец З.Д. Связь параметров концентрации интерлейкинов с показателями спермограммы // *Universum: Химия и биология : электрон. научн. журн.* – 2015. – № 5(13).
18. Межирова Н. М., Данилова В. В., Овчаренко С. С. Патофизиологические и диагностические аспекты синдрома системного воспалительного ответа // *Медицина неотложных состояний.* – 2011. – №. 1. – С32-33.
19. Мещеряков Ю. В., Николаева А. С. Патофизиологические пути развития варикоцелеассоциированного бесплодия // *Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований.* – 2016. – №. 22. – С. 37-46.
20. Николаев С. М. и др. Свободнорадикальное окисление и скрининг антиоксидантов, адаптогенов с использованием биотест-систем // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* – 2010. – №. 2. – С. 196 – 200.
21. Никулина С. Ю. и др. Роль гена интерлейкина-6 в развитии идиопатического синдрома слабости синусового узла // *Российский кардиологический журнал.* – 2016. – №. 10 (138). – С. 32-36.
22. Орадова А. Ш., Канжигалина З. К., Касенова Р. К. Лабораторная диагностика цитокинов (обзорная статья) // *Вестник Казахского Национального медицинского университета.* – 2015. – №. 1 – С. 357 – 359.
23. Останин А. А., Айзикович Б. И., Черных Е. Р. Цитокиновый профиль семенной плазмы человека // *Проблемы репродукции.* – 2006. – Т. 6. – С. 65-74.
24. Тавокина Л. В. Мужское бесплодие. Генетические аспекты // *Почки.* – 2014. – №. 2 (08) – С. 9 -13.
25. Устинов Д. В. и др. Нарушения содержания цитокинов в спермальной плазме у мужчин с бесплодием // *Современные наукоемкие технологии.* – 2014. – №. 12-1 – С. 102.

26. Чанчаева Е. А., Айзман Р. И., Герасев А. Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека // Экология человека. – 2013 – Выпуск № 7 – С. 50 – 58.
27. Azenabor A., Ekun A. O., Akinloye O. Impact of inflammation on male reproductive tract // Journal of reproduction & infertility. – 2015. – V. 16, №. 3. – P. 123.
28. Badouard C. et al. Determination of new types of DNA lesions in human sperm // Zygote. – 2008. – V. 16, №. 1. – P. 9-13.
29. Blackwell J. M., Zaneveld L. J. D. Effect of abstinence on sperm acrosin, hypoosmotic swelling, and other semen variables // Fertility and sterility. – 1992. – V. 58, №. 4. – P. 798-802.
30. Eggert-Kruse W., Boit R., Rohr G. [et al.] Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality // Hum. Reprod. — 2001. — V. 16, № 3. — P. 517—528.
31. Fisher H. M., Aitken R. J. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. – 1997. – V. 277, №. 5. – P. 390-400.
32. Gruschwitz M. S., Brezinschek R., Brezinschek H. P. Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males // Journal of Andrology. – 1996. – V. 17, №. 2. – P. 158-163.
33. Haque O. et al. The effect of smoking on male infertility // Male Infertility. – 2014. – P. 19-30.
34. Jeng H. A. C. et al. Semen quality and sperm DNA damage associated with oxidative stress in relation to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2018. – V. 53, №. 14. – P. 1221-1228.
35. Ji Guixiang, Gu Aihua, Wang Yubang, Huang Cong, Hu Fan, Zhou Yong, Song Ling, Wang Xinru. Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese

population. Free Radical Biology and Medicine Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population // Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – V. 52, №. 4. – P. 775-780.

36. Jones R., Mann T., Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma // Fertility and sterility. – 1979. – V. 31, №. 5. – P. 531-537.

37. Jow W. W., Schleger P. N., Cichon Z., Phillips D., Goldstein M., Bardin C. W. Identification and Localization of Copper—Zinc Superoxide Dismutase Gene Expression in Rat Testicular Development // Journal of andrology. – 1993. – V. 14, №. 6. – P. 439-447.

38. Kensler T. W., Wakabayashi N., Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – V. 47. – P. 89-116.

39. Koçak I., Yenisey Ç., Dündar M., Okyay P., Serter M. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels with semen parameters in fertile and infertile men // Urological research. – 2002. – V. 30, №. 4. – P. 263-267.

40. Lazaros L. A. et al. Association of paraoxonase gene polymorphisms with sperm parameters // Journal of andrology. – 2011. – V. 32, №. 4. – P. 394-401.

41. Lewis, S. E., Sterling E. S. L., Young I. S., Thompson, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men // Fertility and sterility. – 1997. – V. 67, №. 1. – P. 142-147.

42. Li Qian, Qingxi Shi, Yang Gu [et al.] The relationship between IL-17 and male infertility: semen analysis // African Journal of Microbiology Research. —2012. — V. 6(27). — P. 5672— 5677.

43. Lou-Bonafonte J. M. et al. PON1 and Mediterranean diet //Nutrients.

– 2015. – V. 7, №. 6. – P. 4068-4092.

44. Maegawa M., Kamada M., Irahara M., Yamamoto S., Yoshikawa S., Kasai Y., et al. A repertoire of cytokines in human seminal plasma // *J Reprod Immunol.* – 2002. – V 54 (1–2) . – P 33– 42.

45. Nakamura B. N. et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2010. – V. 49, №. 9. – P. 1368-1379.

46. Nandipati K.C., Pasqualotto F.F., Thomas A.J., Agarwal Jr & A Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in vasectomy reversal patients // *Andrologia.* — 2005. — V. 37. — P. 131—134.

47. Popko K., Gorska E., Demkow U. Influence of interleukin-6 and G174C polymorphism in IL-6 gene on obesity and energy balance // *European journal of medical research.* – 2010. – V. 15, №. 2. – P. 123.

48. Sanocka D. et al. Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma // *Journal of andrology.* – 2003. – V. 24, №. 3. – P. 448-455.

49. Shimoya K. Matsuzaki N, Tsutsui T, Taniguchi T, Saji F, Tanizawa: Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia // *Fertil Steril.* – 1993 – V. 59. – P. 885-888.

50. Shukla K. K. et al. Significant association of TNF α and IL-6 gene with male infertility—An explorative study in Indian populations of Uttar Pradesh // *Immunology letters.* – 2013. – V. 30-37, №. 1-2. – P. 156.

51. Suleiman S. A. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E // *Journal of andrology.* – 1996. – V. 17, №. 5. – P. 530-537.

52. Tavailani H. et al. Genotype and phenotype frequencies of paraoxonase 1 in fertile and infertile men // *Systems biology in reproductive medicine.* – 2014. – V. 60, №. 6. – P. 361-366.

53. Tronchon V. et al. Tumor necrosis factor-alpha- 308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility // Human reproduction. – 2008. – V. 23, №. 12. – P. 2858-2866.
54. Yu B., Huang Z. Variations in antioxidant genes and male infertility // BioMed research international. – 2015. – V. 2015 – 10 pages.
55. Zini A., Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase-and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa // International journal of andrology. – 1993. – V. 16, №. 3. – P. 183-188.
56. Zini A., San Gabriel M., Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective // Journal of assisted reproduction and genetics. – 2009. – V. 26, №. 8. – P. 427-432.
57. Zini A., Schlegel P. N. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract // Journal of andrology. – 1996. – V. 17. – P. 473 - 480.
58. Zini A., Schlegel P. N. Expression of glutathione peroxidases in the adult male rat reproductive tract // Fertility and sterility. – 1997. – V. 68, №. 4. – P. 689-695.
59. Zini A., Schlegel P. N. Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis // International journal of andrology. – 1997. – V. 20, №. 2. – P. 86-91.